PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 :
C12N 15/12, 15/85, 15/62, 15/90, 5/10, C07K 14/505, A61K 38/18

A1

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/05268

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 4. Februar 1999 (04.02.99)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/04590

(22) Internationales Anmeldedatum: 22. Juli 1998 (22.07.98)

(30) Prioritätsdaten:

97112640.4	23. Juli 1997 (23.07.97)	EP
197 53 681.6	3. Dezember 1997 (03.12.97)	DE
09/113,692	10. Juli 1998 (10.07.98)	US

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten ausser US)*: BOEHRINGER MANNHEIM GMBH [DE/DE]; Sandhofer Strasse 112–132, D–68305 Mannheim (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: STERN, Anne [DE/DE]; Karwendelstrasse 10, D–82377 Penzberg (DE). BRANDT, Michael [DE/DE]; Faltergatter 29, D–82393 Iffeldorf (DE). HONOLD, Konrad [DE/DE]; Südstrasse 24, D–82377 Penzberg (DE). AUER, Johannes [DE/DE]; Birkenstrasse 29, D–82377 Penzberg (DE). KOLL, Hans [DE/DE]; Adlerweg 2, D–82362 Weilheim (DE).

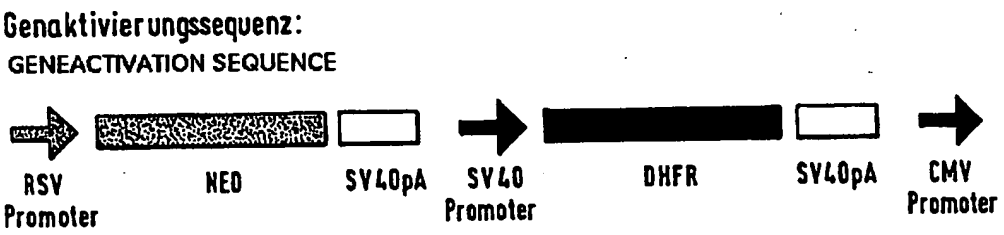
(74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D–81679 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht
Mit internationalem Recherchenbericht.
Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(54) Title: PRODUCTION OF ERYTHROPOIETIN BY ENDOGENOUS GENE ACTIVATION

(54) Bezeichnung: HERSTELLUNG VON ERYTHROPOIETIN DURCH ENDOGENE GENAKTIVIERUNG



(57) Abstract

The invention concerns human cells which, owing to the activation of the endogenous human erythropoietin gene, can produce erythropoietin (EPO) in sufficient quantities and degree of purity to allow human EPO to be economically produced as a pharmaceutical preparation. The invention also concerns a process for producing such human EPO–producing cells, DNA–constructs for activating the endogenous EPO gene in human cells and a process for the large–scale production of EPO in human cells.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft humane Zellen, die aufgrund einer Aktivierung des endogenen humanen EPO–Gens in der Lage sind, EPO in einer ausreichenden Menge und Reinheit zu produzieren, um eine kostengünstige Herstellung von humanem EPO als pharmazeutisches Präparat zu ermöglichen. Weiterhin betrifft die Erfindung ein Verfahren zum Herstellen solcher humaner EPO–produzierender Zellen, DNA–Konstrukte zur Aktivierung des endogenen EPO–Gens in humanen Zellen sowie Verfahren zur großtechnischen Produktion von EPO in humanen Zellen.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Herstellung von Erythropoietin durch endogene Genaktivierung

Beschreibung

Die Erfindung betrifft humane Zellen, die aufgrund einer Aktivierung des endogenen humanen EPO-Gens in der Lage sind, EPO in einer ausreichenden Menge und Reinheit zu produzieren, um eine kostengünstige Herstellung von humanem EPO als pharmazeutisches Präparat zu ermöglichen. Weiterhin betrifft die Erfindung ein Verfahren zum Herstellen solcher humaner EPO-produzierender Zellen, DNA-Konstrukte zur Aktivierung des endogenen EPO-Gens in humanen Zellen sowie Verfahren zur großtechnischen Produktion von EPO in humanen Zellen.

Erythropoietin (EPO) ist ein humanes Glycoprotein, welches die Produktion von roten Blutzellen stimuliert. EPO kommt im Blutplasma von gesunden Personen nur in sehr geringen Konzentrationen vor, so daß eine Bereitstellung in größeren Mengen auf diese Weise nicht möglich ist. EP-B-0148 605 und EP-B-0205 564 beschreiben die Herstellung von rekombinantem humanen EPO in CHO-Zellen. Das in EP-B-0148 605 beschriebene EPO weist ein höheres Molekulargewicht als urinäres EPO und keine O-Glykosilierung auf. Das in EP-B-0 205 564 beschriebene EPO aus CHO Zellen ist mittlerweile in großen Mengen und in reiner Form verfügbar, es stammt jedoch aus nichthumanen Zellen. Weiterhin ist auch die Produktionsleistung von CHO Zellen oft nur relativ begrenzt.

Weiterhin ist die Gewinnung von humanem EPO aus dem Urin von Patienten mit aplastischer Anämie bekannt (Miyake et al., J. Biol. Chem. 252 (1977), 5558 - 5564). Dort wird ein siebenstufiges Verfahren offenbart, welches Ionenaustauscherchromatographie, Ethanolpräzipitation, Gelfiltration und Adsorptionschromatographie umfaßt. Dabei wird in 21%iger Ausbeute ein EPO-Präperat mit einer spezifischen Aktivität von ca. 70.000 U/mg Protein erhalten. Nachteile dieses Verfahrens und

anderer Verfahren zur Gewinnung von urinärem EPO bestehen in der Beschaffung von Ausgangsmaterial in ausreichenden Mengen und mit reproduzierbarer Qualität. Weiterhin ist die Aufreinigung aus Urin schwierig und selbst ein gereinigtes Produkt ist nicht frei von urinären Verunreinigungen.

GB-A-2085 887 beschreibt ein Verfahren zur Herstellung von humanen Lymphoblastoidzellen, die in der Lage sind, EPO in geringen Mengen herzustellen. Die wirtschaftliche Produktion eines Arzneimittels mit diesen Zellen ist nicht möglich.

WO 91/06667 beschreibt ein Verfahren zur rekombinanten Herstellung von EPO. Dabei wird in einer ersten Verfahrensstufe in primären humanen embryonalen Nierenzellen das endogene EPO-Gen durch homologe Rekombination in operative Verknüpfung mit einem viralen Promotor gebracht und die DNA aus diesen Zellen isoliert. In einer zweiten Stufe wird die so isolierte DNA in nichthumane CHO-Zellen transformiert und die Expression von EPO in diesen Zellen analysiert. Es findet sich kein Hinweis, daß eine Produktion von EPO in humanen Zellen möglich ist.

WO 93/09222 beschreibt die Produktion von EPO in humanen Zellen. Dabei wird in humanen Fibroblasten, die mit einem das vollständige EPO-Gen enthaltenden Vektor transfiziert wurden, eine relativ hohe EPO Produktion von bis zu 960.620 $mU/10^6$ Zellen/24 h gefunden. Diese Zellen enthalten ein exogenes EPO-Gen, das sich nicht am korrekten EPO-Genlocus befindet, so daß Probleme hinsichtlich der Stabilität der Zellinie zu erwarten sind. Angaben über eine konstitutive EPO-Produktion finden sich nicht in WO 93/092222. Darüber hinaus finden sich auch keine Angaben, ob das produzierte EPO in einer für pharmazeutische Zwecke ausreichender Qualität erhalten werden kann.

Weiterhin wird in WO 93/09222 eine Aktivierung des endogenen EPO-Gens in humanen HT1080 Zellen beschrieben. Dabei wird eine EPO Produktion von nur 2.500 $mU/10^6$ Zellen/24 h (entsprechend ca. 16 $ng/10^6$ Zellen/24 h) gefunden. Eine derarte geringe Pro-

duktion ist für die wirtschaftliche Produktion eines pharmazeutischen Präparats völlig ungeeignet.

WO94/12650 und WO 95/31560 beschreiben, daß eine humane Zelle mit einem durch einen viralen Promotor aktivierten endogenen EPO-Gen in der Lage ist, nach Amplifikation des endogenen EPO-Gens EPO in einer Menge von bis zu ca. 100.000 mU/10^6 Zellen/24 h (entsprechend ca. 0,6 μg/10^6 Zellen/24 h) zu produzieren. Auch diese Menge reicht noch nicht für die wirtschaftliche Produktion eines Arzneimittels aus.

Die der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende Aufgabe bestand somit darin, die oben genannten Nachteile des Standes der Technik mindestens teilweise zu beseitigen und ein technologisch besseres Verfahren zur Herstellung von EPO in humanen Zellen bereitzustellen. Insbesondere sollte hierdurch ein Produkt in einer ausreichenden Menge und Reinheit erhalten werden können, um die wirtschaftliche Herstellung für pharmazeutische Zwecke zu erlauben.

Diese Aufgabe wird durch Aktivierung des endogenen EPO Gens in humanen Zellen und gegebenenfalls durch anschließende Amplifikation des aktivierten humanen EPO Gens gelöst. Auf diese Weise ist es durch Auswahl geeigneter Ausgangszellen, DNA-Konstrukte und Selektionsstrategien überraschenderweise gelungen, humane Zellen bereitzustellen, die in der Lage sind, EPO in einer ausreichenden Menge, Qualität und Reinheit zu produzieren, die eine kostengünstige Herstellung von pharmazeutischen Präparaten erlaubt. Insbesondere nach Amplifikation des aktivierten endogenen EPO-Gens können Zellen erhalten werden, die eine deutlich höhere Produktionsleistung als die bisher zur Herstellung von rekombinantem EPO verwendeten CHO-Produktionszellen aufweisen.

Ein Gegenstand der Erfindung ist eine humane Zelle, die eine Kopie eines endogenen EPO Gens in operativer Verknüpfung mit einer heterologen, in der humanen Zelle aktiven Expressions-

kontrollsequenz enthält und ohne vorherige Genamplifikation zur Produktion von mindestens 200 ng EPO/10^6 Zellen/ 24 h in der Lage ist. Vorzugsweise ist die erfindungsgemäße humane Zelle zur Produktion von 200 bis 3000 ng EPO/10^6 Zellen/24 h und am meisten bevorzugt zur Produktion von 1000 bis 3000 ng EPO/10^6 Zellen/24 h in der Lage.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine humane Zelle, die durch Genamplifikation aus der zuvor genannten Zelle erhältlich ist und mehrere Kopien eines endogenen EPO-Gens jeweils in operativer Verknüpfung mit einer heterologen, in der humanen Zelle aktiven Expressionskontrollsequenz enthält und zur Produktion von mindestens 1.000 ng EPO/10^6 Zellen/24 h in der Lage ist. Besonders bevorzugt ist die durch Genamplifikation erhältliche humane Zellinie zur Produktion von 1.000 bis 25.000 ng EPO/10^6 Zellen/24 h in der Lage und am meisten bevorzugt zur Produktion von 5.000 bis 25.000 ng EPO/10^6 Zellen/24 h.

Die humane Zelle ist eine beliebige Zelle, vorausgesetzt daß sie in vitro kultiviert werden kann. Besonders bevorzugt sind humane Zellen, die in serumfreien Medium und insbesondere in Suspension kultivierbar sind. Auf diese Weise kann die Produktion von EPO in einem Großfermenter mit beispielsweise 1.000 l Kulturvolumen durchgeführt werden.

Besonders bevorzugt ist die humane Zelle eine immortalisierte Zelle, beispielsweise eine HT 1080 Zelle (Rasheed et al., Cancer 33 (1974), 1027-1033), eine HeLa S3 Zelle (Puck et al., J. Exp. Med. 103 (1956), 273-284), eine Namalwa Zelle (Nadkarni et al., Cancer 23 (1969), 64-79) oder eine davon abgeleitete Zelle. Ein Beispiel für eine erfindungsgemäße Zelle ist der Klon "Aladin", der am 15.07.1997 gemäß den Vorschriften des Budapester Vertrags bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, unter dem Aktenzeichen DSM ACC 2320 hinterlegt wurde.

In der erfindungsgemäßen Zelle ist das endogene EPO-Gen mit einer heterologen Expressionskontrollsequenz verknüpft, die in der humanen Zelle aktiv ist. Die Expressionskontrollsequenz umfaßt einen Promotor und vorzugsweise weitere expressionsverbessernde Sequenzen, z.B. einen Enhancer. Der Promotor kann ein regulierbarer oder ein konstitutiver Promotor sein. Vorzugsweise ist der Promotor ein starker viraler Promotor, z. B. ein SV40 - oder ein CMV Promotor. Besonders bevorzugt ist der CMV Promotor/Enhancer.

Weiterhin kann es zur Optimierung der EPO Expression bevorzugt sein, daß das endogene EPO-Gen in der humanen Zelle, das in operativer Verknüpfung mit dem heterologen Promotor ist, eine Signalpeptid-kodierende Sequenz aufweist, die von der natürlichen Signalpeptid-kodierenden Sequenz verschieden ist und vorzugsweise für ein Signalpeptid mit modifizierter Aminosäuresequenz kodiert. Besonders bevorzugt ist eine Signalpeptid-kodierende Sequenz, die für eine im Bereich der vier ersten Aminosäuren modifizierte Signalpeptidsequenz kodiert, die ausgewählt ist aus

$Met\text{-}X_1\text{-}X_2\text{-}X_3$

worin X_1 Gly oder Ser ist, X_2 Ala, Val, Leu, Ile, Ser oder Pro ist, X_3 und Pro, Arg, Cys oder His ist, mit der Maßgabe, daß $X_1\text{-}X_2\text{-}X_3$ nicht die Sequenz Gly-Val-His ist, und insbesondere aus

(a) Met-Gly-Ala-His,
(b) Met-Ser-Ala-His,
(c) Met-Gly-Val-Pro oder
(d) Met-Ser-Val-His.

Besonders bevorzugt ist die Sequenz der ersten vier Aminosäuren des Signalpeptids Met-Ser-Ala-His.

In einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Herstellen einer humanen EPO-produzierenden Zelle, wie zuvor angegeben, umfassend die Schritte:

(a) Bereitstellen von humanen Ausgangszellen, die mindestens eine Kopie eines endogenen EPO-Gens enthalten,

(b) Transfizieren der Zellen mit einem DNA-Konstrukt umfassend:

(i) zwei flankierende DNA-Sequenzen, die homolog zu Bereichen des humanen EPO Genlocus sind, um eine homologe Rekombination zu erlauben,

(ii) ein positives Selektionsmarkergen und

(iii) eine heterologe Expressionskontrollsequenz, die in der humanen Zelle aktiv ist,

(c) Kultivieren der transfizierten Zellen unter Bedingungen, bei denen eine Selektion auf das Vorhandensein des positiven Selektionsmarkergens stattfindet,

(d) Analysieren der gemäß Schritt (c) selektierbaren Zellen und

(e) Identifizieren der EPO produzierenden Zellen.

Das zur Herstellung der humanen EPO produzierenden Zelle verwendete DNA-Konstrukt enthält zwei flankierende DNA Sequenzen, die homolog zu Bereichen des humanen EPO-Genlocus sind, um eine homologe Rekombination zu erlauben. Die Auswahl geeigneter flankierender Sequenzen erfolgt beispielsweise gemäß den in WO 90/11 354 und WO 91/09 955 beschriebenen Methoden. Vorzugsweise haben die flankierenden Sequenzen jeweils eine Länge von mindestens 150 bp. Besonders bevorzugt werden die homologen DNA-Sequenzen ausgewählt aus dem Bereich der 5'-untranslatierten Sequenzen, Exon 1 und Intron 1 des EPO Gens. Dabei ist es besonders bevorzugt, eine im Bereich von Exon 1 modifizierte DNA Sequenz, die für in den ersten Aminosäuren modifiziertes Signalpeptid kodiert, zu verwenden. Die Modifikationen im Bereich von Exon 1 sind vorzugsweise wie oben angegeben.

Das Selektionsmarkergen kann ein beliebiges für eukaryontische Zellen geeignetes Selektionsmarkergen sein, welches bei Expression zu einem selektierbaren Phänotyp führt, z. B. Antibiotikumresistenz, Auxotrophie etc. Ein besonders bevorzugtes positives Selektionsmarkergen ist das Neomycinphosphotransferasegen.

Gegebenenfalls kann auch ein negatives Selektionsmarkergen wie etwa das HSV-Thymidinkinasegen, durch dessen Expression Zellen in Gegenwart eines Selektionsmittels zerstört werden, vorhanden sein.

Wenn eine Amplifikation des in der humanen Zelle endogen aktivierten EPO-Gens erwünscht wird, enthält das DNA-Konstrukt ein Amplifikationsgen. Beispiele für geeignete Amplifikationsgene sind Dihydrofolatreduktase, Adenosindeaminase, Ornithindecarboxylase etc. Ein besonders bevorzugtes Amplifikationsgen ist das Dihydrofolatreduktasegen, insbesondere ein Dihydrofolatreduktase-Arginin-Mutante, die eine geringere Sensitivität für das selektive Agens (Methotrexat) besitzt als das Wildtyp-Gen (Simonsen et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 80 (1983); 2495).

Bei Anwesenheit eines Amplifikationsgens in dem zur Aktivierung des EPO Gens verwendeten DNA-Konstrukts kann das erfindungsgemäße Verfahren noch die weiteren Schritte umfassen:

(f) Amplifizieren der für EPO kodierenden DNA-Sequenz und

(g) Gewinnen von EPO-produzierenden Zellen, die eine gegenüber der Ausgangszelle erhöhte Kopienzahl einer endogenen für reifes EPO kodierenden DNA-Sequenz in operativer Verknüpfung mit einer heterologen Expressionskontrollsequenz enthalten.

Geeignete DNA-Konstrukte zur Aktivierung des in der humanen Ausgangszelle vorliegenden endogenen EPO-Gens sind die in den Beispielen aufgelisteten Plasmide p187, p189, p190 und p192. Besonders bevorzugt ist das Plasmid p189, das bei der DSMZ

gemäß den Bestimmungen des Budapester Vertrags am 16.07.1997 unter dem Aktenzeichen DSM 11661 hinterlegt wurde, oder ein davon abgeleitetes Plasmid. Die DNA-Konstrukte sind vorzugsweise zirkuläre Plasmidmoleküle, die für die Transfektion der humanen Zelle in einer linearisierten Form eingesetzt werden.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein DNA-Konstrukt zur Aktivierung eines endogenen EPO-Gens in einer humanen Zelle, umfassend:

(i) zwei flankierende DNA-Sequenzen, die homolog zu Bereichen des humanen EPO-Genlocus ausgewählt aus 5'-untranslatierten Sequenzen, Exon 1 und Intron 1 sind, um eine homologe Rekombination zu erlauben, wobei im Bereich von Exon 1 eine modifizierte Sequenz vorliegt, kodierend für die Aminosäuren:

$Met\text{-}X_1\text{-}X_2\text{-}X_3$

worin X_1 Gly oder Ser ist, X_2 Ala, Val, Leu, Ile, Ser oder Pro ist, X_3 und Pro, Arg, Cys oder His ist, mit der Maßgabe, daß $X_1\text{-}X_2\text{-}X_3$ nicht die Sequenz Gly-Val-His ist, und insbesondere für die Aminosäuren:

(a) Met-Gly-Ala-His,
(b) Met-Ser-Ala-His,
(c) Met-Gly-Val-Pro oder
(d) Met-Ser-Val-His,

(ii) ein positives Selektionsmarkergen,

(iii) eine heterologe Expressionskontrollsequenz, die in einer humanen Zelle aktiv ist und

(iv) gegebenenfalls ein Amplifikationsgen.

Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein DNA-Konstrukt zur Aktivierung eines endogenen EPO-Gens in einer humanen Zelle, umfassend:

(i) zwei flankierende DNA-Sequenzen, die homolog zu Bereichen des humanen EPO-Genlocus ausgewählt aus 5'-

untranslatierten Sequenzen, Exon 1 und Intron 1 sind, um eine homologe Rekombination zu erlauben,

(ii) ein positives Selektionsmarkergen,

(iii) eine heterologe Expressionskontrollsequenz, die in einer humanen Zelle aktiv ist, wobei der Abstand zwischen der heterologen Expressionskontrollsequenz und dem Translationstart des EPO-Gens nicht größer als 1100 bp ist, und

(iv) gegebenenfalls ein Amplifikationsgen.

Überraschenderweise wurde festgestellt, daß bei einer Modifizierung der EPO-Signalsequenz oder/und bei einer Verkürzung des Abstands zwischen der heterologen Expressionskontrollsequenz und den Translationsstart des EPO-Gens eine optimierte Expression erhalten wird. Vorzugsweise beträgt der Abstand zwischen dem Promotor der heterologen Expressionkontrollsequenz und dem Translationsstart des EPO-Gens nicht mehr als 1100 bp, besonders bevorzugt nicht mehr als 150 bp und am meisten bevorzugt nicht mehr als 100 bp. Ein besonders bevorzugtes Beispiel für ein erfindungsgemäß zu verwendendes DNA-Konstrukt ist das Plasmid p189 (DSM 11661) oder ein davon abgeleitetes Plasmid.

Noch ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von humanem EPO, wobei man eine erfindungsgemäße humane Zelle unter Bedingungen in einem geeignetem Medium kultiviert, bei denen eine Produktion von EPO erfolgt und das EPO aus dem Kulturmedium gewinnt. Als Medium wird vorzugsweise ein serumfreies Medium verwendet. Die Zellen werden vorzugsweise in Suspension kultiviert. Besonders bevorzugt erfolgt die Kultivierung in einem Fermenter, insbesondere in einem Großfermenter mit einem Volumen von beispielsweise 10 l - 50.000 l.

Die Gewinnung von humanem EPO aus dem Kulturmedium von humanen Zellinien umfasst vorzugsweise folgende Schritte:

(a) Leiten des Zellüberstands über ein Affinitätschromatographiemedium und Gewinnen der EPO enthaltenden Fraktionen,

(b) gegebenenfalls Leiten der EPO enthaltenden Fraktionen über ein hydrophobes Interaktionschromatographiemedium und Gewinnen der EPO enthaltenden Fraktionen,

(c) Leiten der EPO enthaltenden Fraktionen über Hydroxyapatit und Gewinnen der EPO enthaltenden Fraktionen und

(d) Aufkonzentrieren oder/und Leiten über ein Reverse Phase (RP)-HPLC-Medium.

Schritt (a) des Reinigungsverfahrens umfasst das Leiten des Zellüberstands, der gegebenenfalls vorbehandelt sein kann, über ein Affinitätschromatographiemedium. Bevorzugte Affinitätschromatographiemedien sind solche, an die ein blauer Farbstoff gekoppelt ist. Ein besonders bevorzugtes Beispiel ist Blue-Sepharose.

Nach Elution vom Affinitätschromatographiemedium wird das EPO enthaltende Eluat gegebenenfalls über ein hydrophobes Interaktionschromatographiemedium geleitet. Dieser Schritt ist zweckmäßig, wenn ein Kulturmedium mit einem Serumgehalt ≥ 2% (v/v) verwendet wird. Bei Verwendung eines Kulturmediums mit einem geringeren Serumgehalt, z.B. 1% (v/v) oder eines serumfreien Mediums kann dieser Schritt weggelassen werden. Ein bevorzugtes hydrophobes Interaktionschromatographiemedium ist Butyl-Sepharose.

Das Eluat aus Schritt (a) oder - sofern eingesetzt - Schritt (b) wird in Schritt (c) des erfindungsgemäßen Verfahrens über Hydroxyapatit geleitet und das EPO enthaltende Eluat wird einem Aufkonzentrierungsschritt oder/und einem Reverse-Phase-HPLC-Reinigungsschritt unterzogen. Die Aufkonzentrierung erfolgt vorzugsweise durch Ausschlußchromatographie, z.B. Membranfiltration, wobei sich die Verwendung eines Mediums, z.B. einer Membran mit einer Ausschlußgröße von 10 kD als günstig erwiesen hat.

Durch das erfindungsgemäße Verfahren ist ein isoliertes humanes EPO mit einer spezifischen Aktivität von mindestens 100.000 U/mg Protein in vivo (normozythämische Maus) erhältlich, welches frei von urinären Verunreinigungen ist und sich in seiner Glykosilierung von rekombinantem EPO aus CHO Zellen unterscheiden kann. Vorzugsweise hat das erfindungsgemäße EPO eine spezifische Aktivität von mindestens 175.000, besonders bevorzugt von mindestens 200.000 bis 400.000 oder 450.000 IU/mg Protein. Das durch das erfindungsgemäße Verfahren erhältliche humane EPO kann α-2,3- oder/und α-2,6-verknüpfte Sialinsäurereste enthalten. Bei Untersuchungen von EPO aus Zellen, welche ein endogen aktiviertes EPO-Gen enthalten, wurde auf Basis der vorliegenden vorläufigen Ergebnisse das Vorhandensein von α-2,3- und α-2,6-verknüpften Sialinsäureresten gefunden. Darüber hinaus wurde auf Basis der vorliegenden vorläufigen Ergebnisse festgestellt, daß das erfindungsgemäße humane EPO einen Gehalt von weniger als 0,2% N-Glykolneuraminsäure bezogen auf den Gehalt an N-Acetylneuraminsäure aufweist.

Die Reinheit des erfindungsgemäßen humanen EPO beträgt vorzugsweise mindestens 90%, besonders bevorzugt mindestens 95% und am meisten bevorzugt mindestens 98% bezüglich des Gesamtproteingehalts. Die Bestimmung des Gesamtproteingehalts kann durch Reverse Phase HPLC, z.B. mit einer Poros R/2H-Säule erfolgen.

Weiterhin sind durch das erfindungsgemäße Verfahren humane EPO Spezies erhältlich, die sich in ihrer Aminosäuresequenz unterscheiden. So wurde beispielsweise durch massenspektrometrische Analyse (MALDI-MS) gefunden, daß aus HeLa S3 Zellen ein humanes EPO isoliert werden kann, welches überwiegend ein Polypeptid mit einer Länge von 165 Aminosäuren, das durch C-terminale Prozessierung eines Argininrests entstanden ist, und gegebenenfalls bis zu 15% eines EPO mit 166 Aminosäuren umfaßt. Weiterhin ist auch ein humanes EPO erhältlich, welches ein Polypeptid mit einer Länge von 166 Aminosäuren, d.h. ein

nichtprozessiertes EPO, umfasst. Aus Namalwa Zellen konnte beispielsweise ein humanes EPO isoliert werden, welches ein Gemisch aus Polypeptiden mit einer Länge von 165 und 166 Aminosäuren umfasst.

Dieses humane EPO kann als Wirkstoff für ein pharmazeutisches Präparat eingesetzt werden, das gegebenenfalls weitere Wirkstoffe sowie pharmazeutisch übliche Hilfs-, Träger- und Zusatzstoffe enthalten kann.

In einem noch weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung eine isolierte DNA, die für ein humanes EPO mit einer im Bereich der ersten 4 Aminosäuren des Signalpeptids modifizierten Sequenz kodiert, die ausgewählt ist aus:

$Met\text{-}X_1\text{-}X_2\text{-}X_3$

worin X_1 Gly oder Ser ist, X_2 Ala, Val, Leu, Ile, Ser oder Pro ist, X_3 und Pro, Arg, Cys oder His ist, mit der Maßgabe, daß $X_1\text{-}X_2\text{-}X_3$ nicht die Sequenz Gly-Val-His ist, und insbesondere für die Aminosäuren:

(a) Met-Gly-Ala-His,
(b) Met-Ser-Ala-His,
(c) Met-Gly-Val-Pro oder
(d) Met-Ser-Val-His.

Die DNA kann beispielsweise eine genomische DNA oder eine cDNA sein.

Weiterhin wird die Erfindung durch die nachfolgenden Beispiele und Abbildungen und Sequenzprotokolle erläutert.

Es zeigen:

Abbildung 1: Eine schematische Darstellung der Amplifikation von Homologieregionen des EPO-Gens aus dem Be-

reich der 5'-untranslatierten Sequenzen, Exon 1 und Intron 1;

Abbildung 2: Eine schematische Darstellung eines Plasmids, welches EPO-Homologieregionen aus dem Bereich der 5'-untranslatierten Sequenzen, Exon 1 und Intron 1 enthält;

Abbildung 3: Eine schematische Darstellung einer Genaktivierungssequenz, die den Rous-Sarcomavirus-Promotor (RSV), das Neomycinphosphotransferasegen (NEO), die frühe Polyadenylierungsregion von SV40 (SVI pA), den frühen SV40 Promotor (SVI), das Dihydrofolatreduktasegen (DHFR), eine weitere frühe SV40-Polyadenylierungsregion und den Cytomegalovirus Immediate-early-Promotor und Enhancer (MCMV) enthält;

Abbildung 4a: Die Herstellung des EPO-Gentargetingvektors p176;

Abbildung 4b: Die Herstellung der EPO-Gentargetingvektoren p179 und p187;

Abbildung 4c: Die Herstellung des EPO-Gentargetingvektors p189 (DSM 11661);

Abbildung 4d: Die Herstellung des EPO-Gentargetingvektors p190;

Abbildung 4e: Die Herstellung des EPO-Gentargetingvektors p192;

Abbildung 5: Eine schematische Darstellung der Herstellung von EPO cDNA mit Signalsequenzmutationen;

Abbildung 6a: Die Hybridisierung zellulärer DNA mit einer Sonde aus dem CMV-Bereich der in Abb. 3 dargestellten Gen-Kassette; die Spuren 1 bis 4 sind jeweils mit den Restriktionsenzymen AgeI und AscI gespaltene DNA aus humanen Zellen; Spur 1: EPO-produzierende HeLa S3 Zelle mit 1.000 nM MTX amplifiziert; Spur 2: EPO-produzierende HeLa S3 Zelle mit 500 nM MTX amplifiziert; Spur 3: EPO-prodzierende HeLa S3 Zelle ohne Amplifikation; Spur 4: HeLa S3 Zelle ohne aktiviertes EPO-Gen; Spur 5: Digoxigenin-markierte Längenmarker; die Größe des hybridisierenden Fragments in den Spuren 1 bis 3 ist ca. 5.200 bp und

Abbildung 6b: Die Hybridisierung einer Sonde aus dem kodierenden Bereich von EPO mit DNA aus humanen Zellen; Spur 1: Digoxigenin-markierte Längenmarker; Spuren 2 bis 4: DNA aus humanen Zellen gespalten mit den Restriktionsenzymen BamHI, HindIII und SalI; Spur 2: EPO produzierende HeLa S3 Zelle amplifiziert mit 500 nM MTX (Länge der durch das nichtaktivierte endogene Gen erzeugten Bande: 3.200 bp; Länge der durch Gentargeting aktivierten Kopie des EPO-Gens: 2.600 bp); Spur 3: DNA aus einer EPO produzierenden HeLa S3 Zelle nichtamplifiziert; Spur 4: DNA aus einer HeLa S3 Kontrollzelle;

SEQ ID NO. 1 und NO. 2 Nukleotidsequenzen der zur Herstellung des PCR Produkts 1 (Abb. 1) verwendeten Primer;

SEQ ID NO. 3 und NO. 4 Sequenzen der zur Herstellung des PCR Produkts 2 (Abb. 1) verwendeten Primer;

SEQ ID NO. 5 Sequenz des Primers EPO EX1;

SEQ ID NO. 6 Sequenz des Primers EX2;

SEQ ID NO. 7 Sequenz des Primers EX3 (Met-Gly-Ala-His);

SEQ ID NO. 8 Sequenz des vom Primer EX3 kodierten modifizierten Signalpeptidstarts;

SEQ ID NO. 9 Sequenz des Primers EX4 (Met-Ser-Ala-His);

SEQ ID NO. 10 Sequenz des vom Primer EX4 kodierten modifizierten Signalpeptidstarts;

SEQ ID NO. 11 Sequenz des Primers EX5 (Met-Gly-Val-Pro);

SEQ ID NO. 12 Sequenz des vom Primer EX5 kodierten modifizierten Signalpeptidstarts;

SEQ ID NO. 13 Seqenz des Primers EX6 (Met-Ser-Val-His);

SEQ ID NO. 14 Sequenz des vom Primer EX6 kodierten modifizierten Signalpeptidstarts;

SEQ ID NO. 15 Sequenz des Primers EX Genom 1;

SEQ ID NO. 16 Sequenz des Primers EX13 und

SEQ ID NO. 17 Sequenz des Primers EPO EX 17.

Beispiele

Die Aktivierung des EPO Genlocus für die Proteinproduktion im industriellen Maßstab wurde durch homologe Integration einer Genaktivierungssequenz erreicht, welche das Neomycinphosphotransferase (NEO)-Gen zur Selektion (G-418 Resistenz), das murine Dihydrofolatreduktase (DHFR)-Gen (zur Genamplifikation durch MTX) und den Cytomegalovirus (CMV)-Immediate-Early-Promotor und Enhancer zur Genaktivierung enthält.

Beispiel 1 Klonierung von EPO-Homologieregionen

Homologieregionen des EPO-Gens wurden durch PCR unter Verwendung einer genomischen Placenta DNA (Boehringer Mannheim) amplifiziert. Dabei wurden aus einer 6,3 kB langen Homologieregion aus dem Bereich der 5'-untranslatierten Sequenzen des EPO-Gens, Exon 1 und Intron 1 zwei PCR-Produkte hergestellt (vgl. Figur 1). Die zur Herstellung des PCR-Produkts 1 verwendeten Primer hatten folgende Sequenzen: 5'-CGC GGC GGA TCC CAG GGA GCT GGG TTG ACC GG-3' (SEQ ID NO. 1) und 5'-GGC CGC GAA TTC TCC GCG CCT GGC CGG GGT CCC TCA GC-3' (SEQ ID NO. 2). Die zur Herstellung des PCR-Produkts 2 verwendeten Primer hatten folgende Sequenzen: 5'-CGC GGC GGA TCC TCT CCT CCC TCC CAA GCT GCA ATC-3' (SEQ ID NO. 3) und 5'-GGC CGC GAA TTC TAG AAC AGA TAG CCA GGC TGA GAG-3' (SEQ ID NO. 4).

Aus den PCR-Produkten 1 und 2 wurden die gewünschten Segmente durch Restriktionsspaltung (PCR-Produkt 1: HindIII, PCR-Produkt 2: HindIII und Eco RV) herausgeschnitten und in den Vektor pCRII (Invitrogen), der mit Hind III und Eco RV gespalten war, kloniert. Der auf diese Weise erhaltene rekombinante Vektor wurde 5epopcr1000 bezeichnet (vgl. Figur 2).

Beispiel 2 Konstruktion von EPO Gen Targetingvektoren

2.1 Eine Genaktivierungssequenz, die das NEO-Gen, das DHFR Gen und einen CMV Promotor/Enhancer enthält (vgl. Fig. 3) wurde in die AgeI Stelle des die EPO Homologieregion enthaltenden Plasmids 5epocr1000 inseriert, wobei das Plasmid p176 erhalten wurde (vgl. FIG. 4a). Um den CMV Promotor möglichst nahe an die Translationstartstelle des EPO Gens zu bringen, wurde ein 963 bp langes Segment zwischen den Restriktionsstellen AscI und AgeI (partielle Spaltung) deletiert, wobei das Plasmid p179 erhalten wurde (Fig. 4b).

2.2 Um eine Optimierung der Expression zu erreichen, wurden Nukleotide in Exon 1, die für den Beginn der EPO-Leadersequenz Met-Gly-Val-His kodieren, durch die synthetische Sequenz Met-Ser-Ala-His ersetzt (vgl. auch Beispiel 6). Diese Sequenz wurde durch Amplifikation einer genomischen EPO-DNA-Sequenz, z.B. des Plasmids pEPO148, das ein 3,5 kB BstEII/EcoRI-Fragment (inklusive der Exons 1-5) der humanen EPO Gensequenz unter Kontrolle des SV40 Promotors enthält (Jacobs et al., Nature 313 (1985), 806 und Lee-Huang et al., Gene 128 (1993), 227), als Matrize mit den Primern Ex4 (SEQ ID NO. 9) und Ex17 (SEQ ID NO. 17) (Tabelle 1) erhalten. Dabei wurde das Plasmid p187 erhalten (Fig. 4b).

2.3 Das Plasmid p189 wurde aus dem Plasmid p187 durch Insertion des Herpes Simplex Virus-Thymidinkinasegens (HSV-TK), welches aus Psvtk-1 (PvuII/NarI Fragment) stammte, hergestellt (Fig. 4c). Das HSV-TK-Gen befindet sich unter Kontrolle des SV40 Promotors am 3'-Ende von Intron 1 (Eco RV/ClaI) in entgegengesetzter Orientierung relativ zum CMV Promotor und sollte zur negativen Selektion auf eine homologe Rekombination dienen.

2.4 Zur Konstruktion von Plasmid p190 wurde ein SfiI/BglII Fragment von pHEAVY, einem Plasmid, das die cDNA einer bei Simonsen et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 (1983), 2495) beschriebene Arginin-Mutante von DHFR enthält, in das mit SfiI und BglII geschnittene Plasmid pGenak-1 subkloniert, das das NEO-Gen unter Kontrolle des RSV-Promotors und der späten SV40 Polyadenylierungsstelle als Terminator, das murine DHFR-Gen unter Kontrolle des frühen SV40 Promotors und der frühen SV40 Polyadenylierungsstelle als Terminator (Kaufmann et al., Mol. Cell. Biol. 2 (1982), 1304; Okayama et al., Mol. Cell. Biol. 3 (1983), 280 und Schimke, J. Biol. Chem. 263 (1988), 5989) und den CMV-Promotor (Boshart et al., Cell 41 (1995), 521) enthält. Anschließend wurde ein HpaI Fragment, wel-

ches die für die DHFR-Arginin-Mutante kodierende cDNA enthielt, in das mit HpaI geschnittene Plasmid p189 ligiert, wobei das Plasmid p190 erhalten wurde (Fig. 4d).

2.5 Um einen Transfektionsvektor ohne das HSV-TK Gen zu erhalten, wurde ein AscI/NheI Fragment des Plasmid p190, welches die Genaktivierungssequenz enthielt, in ein das Exon 1 enthaltendes AscI/NheI Fragment des Plasmids p187 ligiert. Das resultierende Plasmid wurde p192 genannt (Fig. 4e).

Beispiel 3 Transfektion von Zellen

Es wurden verschiedene Zellinien auf die Produktion von EPO selektioniert und mit Targetingvektoren transfiziert.

3.1 Namalwazellen

Die Zellen wurden in T150 Gewebekulturflaschen gezüchtet und durch Elektroporation (1 x 10^7 Zellen/800 µl Elektroporationspuffer 20 mM Hepes, 138 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,7 mM Na_2HPO_4, 6 mM D-Glucose-Monohydrat pH 7,0, 10 µg linearisierte DNA, 960 µF, 260 V BioRad Gene Pulser) transfiziert. Nach der Elektroporation wurden die Zellen in RPMI 1640, 10% (v/v) fötalem Kälberserum (FCS), 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat in vierzig 96-Lochplatten gezüchtet. Nach zwei Tagen wurden die Zellen für 10 bis 20 Tage in 1 mg/ml G-418 enthaltendem Medium kultiviert. Der Überstand wurde in einem Festphasen-ELISA auf die Produktion von EPO getestet (siehe Beispiel 4). Die EPO produzierenden Klone wurden in 24-Lochplatten und T-25 Gewebekulturflaschen expandiert. Aliquots wurden eingefroren und die Zellen wurden durch FACS (Ventage, Beckton Dickinson) subkloniert. Die Subklone wurden wiederholt auf EPO-Produktion gestestet.

3.2 HT 1080 Zellen

Die Bedingungen waren wie für Namalwazellen beschrieben, außer daß die HT1080 Zellen in DMEM, 10% (v/v) FCS, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat kultiviert wurden. Zur Transfektion durch Elektroporation wurden die Zellen durch Typsinisierung von den Wänden der Kulturgefäße abgelöst. Nach der Elektroporation wurden 1 x 10^7 Zellen in DMEM, 10% (v/v) FCS, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat in 5 96-Lochplatten kultiviert.

3.3 HeLa S3 Zellen

Die Bedingungen waren wie für Namalwalzellen beschrieben, außer daß die Helazellen in RPM 1640, 10% (v/v) FCS, 2 mM L-Glutamin, 1% (v/v) MEM nichtessentiellen Aminosäuren (Sigma), 1 mM Natriumpyruvat kultiviert wurden. Zur Transfektion durch Elektroporation wurden die Zellen durch Trypsinisierung von den Wänden der Kulturgefäße abgelöst. Die Bedingungen für die Elektroporation waren 960 µF/250 V. Nach der Elektroporation wurden die Zellen in RPMI 1640, 10% (v/v) FCS, 2 mM L-Glutamin, 1% (v/v) MEM, 1 mM Natriumpyruvat in T75 Gewebekulturflaschen kultiviert. 24 Stunden nach Elektroporation wurden die Zellen trypsinisiert und für 10 bis 15 Tage in einem 600 µg/ml G-418 enthaltenden Medium in 10 96-Lochplatten kultiviert.

Beispiel 4 Selektion auf EPO produzierende Klone

Der Kulturüberstand von transfizierten Zellen wurde in einem EPO ELISA getestet. Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Mit Streptavidin vorbeschichtete 96-Lochplatten wurden mit biotinylierten Anti-EPO-Antikörpern (Boehringer Mannheim) beschichtet. Zur Beschichtung wurden die Platten zunächst mit 50 mM Natriumphosphat pH 7,2, 0,05% (v/v) Tween 20 gewaschen. Dann wurden pro Loch 0,01 ml Beschichtungspuffer (4 µg/ml biotinylierter Antikörper, 10 mM Natriumphosphat pH 7,2, 3 g/l Rinderserumalbumin, 20 g/l Saccharose, 9 g/l NaCl)

zugegeben und 3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden die Platten mit 50 mM Natriumphosphat pH 7,2 gewaschen, getrocknet und eingeschweißt.

Vor dem Test wurden die Platten nach dreimaligem Waschen mit 0,3 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS), 0,05 % Tween 20 (Sigma) über Nacht mit 0,2 ml PBS, 1 % (w/v) Crotein (Boehringer Mannheim) pro Loch inkubiert, um unspezifische Bindungen zu blockieren.

Nach Entfernung der Blockierungslösung wurden 0,1 ml Kulturüberstand zugegeben und die Platten wurden über Nacht inkubiert. Die einzelnen Löcher wurden dreimal mit jeweils 0,3 ml PBS, 0,05 % Tween 20 gewaschen. Dann wurden 100 µl Peroxidase (POD)-konjugierter monoklonaler Antikörper (Boehringer Mannheim, 150 mU/ml) für zwei Stunden zugegeben. Die Löcher wurden anschließend wieder dreimal mit jeweils 0,3 ml PBS, 0,05 % Tween 20 gewaschen. Dann wurde die Peroxidasereaktion unter Verwendung von ABTS® als Substrat in einem Perkin Elmer Photometer bei 405 nm durchgeführt. Eine Standardeichkurve unter Verwendung von rekombinantem EPO aus CHO-Zellen (Boehringer Mannheim, 100-1000 pg/Loch) wurde zur Berechnung der EPO-Konzentrationen verwendet.

Beispiel 5 EPO-Genamplifizierung

Zur Erhöhung der EPO Expression wurden die EPO produzierenden Klone in Gegenwart steigender Konzentrationen (100 pM-1000 nM) Methotrexat (MTX) kultiviert. Bei jeder MTX Konzentration wurden die Klone durch einen ELISA (siehe Beispiel 4) auf Produktion von EPO getestet. Starke Produzenten wurden durch limitierte Verdünnung subkloniert.

Beispiel 6 Signalsequenzmutationen

Um die Leadersequenz des EPO Moleküls zu optimieren, wurden die ersten von Exon 1 kodierten Aminosäuren ausgetauscht.

Primer mit verschiedenen Sequenzen (SEQ ID NO. 4-17; der 3'-Primer enthielt eine CelII Stelle zur Selektion von modifizierten Sequenzen) wurden verwendet, um ein AscI/XbaI Fragment durch PCR unter Verwendung von Plasmid pEPO227, das ein 4 kB HindIII/EcoRI Fragment (inklusive der Exon 1-5) der humanen EPO-Gensequenz unter Kontrolle des SV40 Promotors enthält (Jacobs et al., Nature 313 (1985), 806; Lee-Huang et al., Gene 128 (1993), 227), als Matritze zu erhalten. Die resultierenden Fragmente wurden anschließend in das Plasmid pEPO148 (Beispiel 2.2) kloniert, wobei die Plasmide pEPO 182, 183, 184 und 185 erhalten wurden (Figur 5). Die EPO-Genexpression wurde durch einen SV40 Promotor angetrieben. COS-7 Zellen wurden transient mit den Konstrukten (DEAE-Dextranmethode) transfiziert und die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion auf die EPO Produktion getestet.

Die auf diese Weise erhaltene mutierte Leadersequenz Met-Ser-Ala-His mit der besten EPO-Expression wurde zur Konstruktion der Gentargetingvektoren eingesetzt (vgl. Beispiel 2.2).

Beispiel 7 Charakterisierung von EPO-produzierenden Zellinien

Drei verschiedene Zellinien (Namalwa, HeLa S3 und HT 1080) wurden zur EPO Genaktivierung ausgewählt. EPO-produzierende Klone wurden durch Transfektion mit den Plasmiden p179, p187, p189, p190 oder p192 erhalten (vgl. Beispiele 2 und 3).

Es wurden ca. 160.000 NEO-resistente Klone auf die EPO-Produktion getestet, von denen 12-15 EPO in signifikanter Ausbeute reproduzierbar in den Zellüberstand sekretierten.

Davon konnten überraschenderweise ohne Genamplifikation durch MTX insgesamt 7 EPO-Klone identifiziert werden, die EPO in ausreichenden Mengen für ein großtechnische Produktion erzeugten. Die EPO-Produktion dieser Klone lag im Bereich von 200 ng/ml bis mehr als 1000 ng/ml/10^6 Zellen/24 h. Ein Beispiel

einer solchen Zelle ist der bei der DSMZ hinterlegte Klon "Aladin" (DSM ACC 2320), der aus einer Namalwazelle erhalten wurde.

Nach Genamplifikation mit 500 nM MTX konnte die EPO-Produktion der identifizierten EPO-Klone auf bis zu mehr als 3000 ng/ml-/10^6 Zellen/24 h gesteigert werden. Eine weitere Erhöhung der MTX Konzentration auf 1000 nM führte zu einer Produktion von bis zu mehr als 7000 ng/ml/10^6 Zellen/24 h.

Die erhaltenen Klone zeigten eine EPO Produktion auch unter serumfreien Kulturbedingungen.

Beispiel 8 Charakterisierung des Genoms vom EPO-produzierenden Klonen

8.1 Methodik

Humane genomische DNA wurde aus ca. 10^8 Zellen isoliert und quantifiziert (Sambrook et al., 1989). Nach Spaltung der genomischen DNA mit Restriktionsenzymen, z. B. AgeI und AscI bzw. BamHI, Hind III und SalI wurden die DNA Fragmente durch Agarosegelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt und schließlich auf eine Nylonmembran transferiert und immobilisiert.

Die immobilisierte DNA wurde mit Digoxigenin-markierten EPO- oder Genaktivierungssequenz-spezifischen DNA-Sonden hybridisiert (DIG DNA Labeling Kit, Boehringer Mannheim) und unter stringenten Bedingungen gewaschen. Die spezifischen Hybridisierungssignale wurden mit Hilfe eine Chemilumineszenzverfahrens unter Einsatz strahlungsempfindlicher Filme detektiert.

8.2 Ergebnisse

Die Behandlung von Zellen mit 500 nM MTX führte zu einer Verstärkung des Hybridisierungssignals im EPO-Locus um den Faktor

5 bis 10. Bei einer weiteren Steigerung auf 1000 nM MTX wurde eine Verstärkung um den Faktor > 10 erhalten (Figur 6a).

Im Falle der Hybridisierung mit der EPO-spezifischen Sonde wurden auch die durch homologe Rekombination nicht getroffenen Kopien des Chromosoms 7 detektiert. Wie in Figur 6b zu sehen ist, weisen diese ebenfalls hybridisierenden DNA-Fragmente eine andere, deutlich unterscheidbare Größe auf und werden durch den Einsatz von MTX nicht in ihrer Signalstärke verändert.

Beispiel 9 Aufreinigung von EPO aus Kulturüberständen humaner Zellinien (Hela S3; Namalwa und HT1080)

Im wesentlichen wurden zur Aufreinigung von EPO aus Zellkulturüberständen humaner Zellinien zwei Methoden verwendet, die sich in Anzahl und Prinzip der Chromatographieschritte unterschieden und abhängig von der Zusammensetzung des Mediums und der EPO-Konzentration eingesetzt wurden:

Methode 1:	1. Schritt:	Blue-Sepharose-Säule
	2. Schritt:	Butyl-Sepharose-Säule
	3. Schritt:	Hydroxyapatit-Säule
	4. Schritt:	Aufkonzentrierung
Methode 2:	1. Schritt:	Blue-Sepharose-Säule
	2. Schritt:	Hydroxyapatit-Säule
	3. Schritt:	Aufkonzentrierung
	(alternativer 3. Schritt:	RP-HPLC)

Beispiel für eine Aufreinigung eines HeLaS3-Zellkulturüberstandes mit 2 % (v/v) fötalem Kälberserum (FKS) nach Methode 1:

1. Blue Sepharose-Säule:

Eine 5 ml Hi-Trap-Blue-Säule (Blue-Sepharose-Fertigsäule von Pharmacia) wurde mit mindestens 5 Säulenvolumina (SV) Puffer A

(20 mM Tris-HCl, pH, 7,0; 5 mM $CaCl_2$; 100 mM NaCl) äquilibriert. Anschließend wurden 70 ml Hela-Zellüberstand (ca. 245 µg EPO und 70-100 mg Gesamtprotein enthaltend) über Nacht bei einem Fluß von 0,5 ml/min im Kreislaufverfahren aufgezogen.

Die Säule wurde mit mindestens 5 SV Puffer B (20mM Tris-HCl, pH 7,0; 5 mM $CaCl_2$; 250 mM NaCl) und mindestens 5 SV Puffer C (20mM Tris-HCl, pH 7,0; 0,2 mM $CaCl_2$, 250 mM NaCl) bei 0,5 ml/min gewaschen. Der Wascherfolg wurde über die Messung des Proteingehalts bei OD280 verfolgt.

Die Elution von EPO erfolgte mit Puffer D (100 mM Tris-HCl, pH 7,0; 0,2 mM $CaCl_2$; 2 M NaCl) bei einem Fluß von 0,5 ml/min. Die Elutionslösung wurde in 1-2 ml Fraktionen gesammelt.

Der EPO-Gehalt der Fraktionen, der Waschlösungen und des Durchlaufs wurden über Reverse-Phase (RP)-HPLC durch Auftrag eines Aliquots auf eine POROS R2/H-Säule (Boehringer Mannheim) bestimmt. Alternativ wurde zur qualitativen Identifizierung EPO-haltiger Fraktionen ein immunologischer Dotblot durchgeführt.

EPO-haltige Fraktionen (8-12 ml) wurden gepoolt und auf eine Butyl-Sepharose-Säule aufgetragen.

Die Ausbeute nach der Blue-Sepharose-Säule betrug ca. 175 µg EPO (entspricht ca. 70%). Im Allgemeinen betrug die Ausbeute nach Blue-Sepharose zwischen 50-75%.

2. Butyl-Sepharose-Säule (Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie)

Eine selbsthergestellte 2-3 ml Butyl-Sepharose-Säule (Material: Toyopearl Butyl S650) wurde mit mindestens 5 SV Puffer D (100 mM Tris-HCl, pH 7,0; 0,2 mM $CaCl_2$; 2 M NaCl) äquilibriert

und anschließend der EPO-haltige Blue-Sepharose-Pool aus 1. (ca. 150 µg EPO) bei einem Fluß von 0,5 ml/min aufgezogen.

Die Säule wurde mit mindestens 5 SV Puffer E (20 mM Tris-HCl, pH 7,0; 2 M NaCl und 10 % Isopropanol) bei 0,5 ml/min gewaschen. Der Wascherfolg wurde über die Messung des Proteingehalts bei OD280 verfolgt.

Die Elution von EPO erfolgte mit Puffer F (20 mM Tris-HCl, pH 7,0; 2 M NaCl und 20 % Isopropanol) bei einem Fluß von 0,5 ml/min. Die Elutionslösung wurde in 1-2 ml Fraktionen gesammelt.

Der EPO-Gehalt der Fraktionen, der Waschlösungen und des Durchlaufs wurden über RP-HPLC durch Auftrag eines Aliquots auf eine POROS R2/H-Säule bestimmt. Alternativ wurde zur qualitativen Identifizierung EPO-haltiger Fraktionen ein immunologischer Dotblot durchgeführt.

EPO-haltige Fraktionen (10-15 ml) wurden gepoolt und auf eine Hydroxyapatit-Säule aufgetragen.

Die Ausbeute der Butyl-Sepharose-Säule betrug ca. 130 µg EPO (entspricht ca. 85 %). Im Allgemeinen betrug die Ausbeute der Butyl-Sepharose zwischen 60-85% vom Auftrag der Blue-Sepharose-Pools.

3. Hydroxyapatit-Säule

Eine 5 ml Hydroxyapatit-Säule (Econo-Pac CHT II-Fertigsäule von BioRAD) wurde mit mindestens 5 SV Puffer F (20 mM Tris-HCl, pH 7,0; 2 M NaCl; 20% Isopropanol) äquilibriert und anschließend der EPO-haltige Butyl-Sepharose-Pool aus 2. (ca. 125 µg EPO) bei einem Fluß von 0,5 ml/min aufgezogen.

Die Säule wurde mit mindestens 5 SV Puffer G (20 mM Tris-HCl, pH 7,0; 2 M NaCl) bei 0,5 ml/min gewaschen. Der Wascherfolg wurde über die Messung des Proteingehalts bei OD280 verfolgt.

Die Elution von EPO erfolgte mit Puffer H (10 mM Na-Phosphat, pH 7,0; 80 mM NaCl) bei einem Fluß von 0,5 ml/min. Die Elutionslösung wurde in 1-2 ml Fraktionen gesammelt.

Der EPO-Gehalt der Fraktionen, der Waschlösungen und des Durchlaufs wurden über RP-HPLC durch Auftrag eines Aliquots auf eine POROS R2/H-Säule bestimmt.

EPO-haltige Fraktionen (3-6 ml) wurden gepoolt. Die Ausbeute der Hydroxyapatit-Säule betrug ca. 80 µg EPO (entspricht ca. 60%). Im Allgemeinen betrug die Ausbeute der Hydroxyapatit-Säule zwischen 50-65% vom Auftrag der Butyl-Sepharose-Pools.

4. Aufkonzentrierung

Die gepoolten EPO-Fraktionen aus dem Hydroxyapatit-Schritt wurden in Zentrifugationseinheiten mit einer Ausschlußgröße von 10 kD (z.B. Microsep von Filtron) auf eine Konzentration von 0,1-0,5 mg/ml aufkonzentriert, mit 0,01% Tween 20 versetzt und in Aliquots bei -20°C gelagert.

Ausbeuteschema:

	EPO (µg)	Ausbeute (%)
Ausgang	245	100
Blue-Sepharose	175	70
Butyl-Sepharose-Säule	130	53
Hydroxyapatit-Säule	80	33
Aufkonzentrierung	60	25

Die Reinheit des isolierten EPO war etwa > 90%, in der Regel sogar > 95%.

Zur Erhöhung der EPO-Ausbeute wurde auch die Methode 2 verwendet, bei der der Butyl-Sepharose-Schritt fehlte. Vor allem bei Zellkulturüberständen ohne oder mit 1% (v/v) FKS-Zusatz ist diese Methode anwendbar und liefert isoliertes EPO von ungefähr gleicher Reinheit (90-95%). Die Anwesenheit von 5 mM $CaCl_2$ im Äquilibrierungspuffer (Puffer F) für die Hydroxyapatit-Säule führte bei dieser Methode zu einer verbesserten Bindung und damit auch zu einem reproduzierbaren Elutionsverhalten von EPO beim Hydroxyapatit-Schritt. Deshalb wurde bei Methode 2 bei prinzipiell gleichem Ablauf wie Methode 1 mit folgenden Puffern durchgeführt:

1. Blue-Sepharose-Säule:

Äquilibrierpuffer (Puffer A):	20 mM Tris-HCl, pH 7,0; 5 mM $CaCl_2$; 100 mM NaCl
Waschpuffer 1 (Puffer B):	20 mM Tris-HCl, pH 7,0; 5 mM $CaCl_2$; 250 mM NaCl
Waschpuffer 2 (Puffer C):	20 mM Tris-HCl, pH 7,0; 5 mM $CaCl_2$, 250 mM NaCl
Elutionspuffer (Puffer D):	100 mM Tris-HCl, pH 7,0; 5 mM $CaCl_2$; 2 M NaCl

2. Hydroxyapatit-Säule

Äquilibrierpuffer (Puffer F):	50 mM Tris-HCl, pH 7,0; 5 mM $CaCl_2$; 1 M NaCl
Waschpuffer (Puffer G):	10 mM Tris-HCl, pH 7,0; 5 mM $CaCl_2$; 80 mM NaCl
Elutionspuffer (Puffer H):	10 mM Na-Phosphat, pH 7,0; 0,5 mM $CaCl_2$; 80 mM NaCl

Ausbeuteschema:

	EPO (µg)	Ausbeute (%)
Ausgang	600	100
Blue-Sepharose	450	75
Hydroxyapatit-Säule	335	55
Aufkonzentrierung	310	52

Der Zusatz von 5 mM $CaCl_2$ in die Puffer B bis G bei Methode 1 führte ebenfalls zu einer besseren Bindung und definierteren Elution von der Hydroxyapatit-Säule.

Beispiel 10 Bestimmung der spezifischen Aktivität in vivo von EPO aus humanen Zellinien (Bioassay an der normozythämischen Maus)

Die dosis-abhängige Aktivität von EPO auf die Vermehrung und Differenzierung von Erythrocyten-Vorläuferzellen wurde in vivo in Mäusen über den Anstieg der Reticulocyten im Blut nach EPO-Gabe bestimmt.

Hierzu wurde je acht Mäusen verschiedene Dosen der zu analysierenden EPO-Probe und eines EPO-Standards (abgeglichen gegen den EPO-WHO-Standard) parenteral verabreicht. Die Mäuse wurden anschließend unter konstanten, definierten Bedingungen gehalten. 4 Tage nach EPO-Gabe wurden den Mäusen Blut entnommen und die Reticulocyten mit Acridinorange angefärbt. Die Bestimmung der Reticulocytenzahl pro 30000 Erythrocyten erfolgte mikrofluorimetrisch im Durchflußcytometer durch Analyse des Rotfluoreszenz-Histogramms.

Die Berechnung der biologischen Aktivität erfolgte aus den Werten für die Reticulocytenzahlen der Probe und des Standards bei den unterschiedlichen Dosen nach dem von Linder beschriebenen Verfahren der paarweisen Gehaltsbestimmung mit parallelen Geraden (A. Linder, Planen und Auswerten von Versuchen, 3. Auflage, 1969, Birkenhäuser Verlag Basel).

Ergebnis:

EPO aus Zellinie	spezifische Aktivität U/mg
Hela S3 (Probe 1)	100.000
Hela S3 (Probe 2)	110.000

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:
(A) NAME: Boehringer Mannheim GmbH
(B) STRASSE: Sandhofer Str. 112-132
(C) ORT: Mannheim
(E) LAND: Deutschland
(F) POSTLEITZAHL: 68305

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Herstellung von Erythropoietin durch endogene Genaktivierung

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 17

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:
(A) DATENTRÄGER: Floppy disk
(B) COMPUTER: IBM PC compatible
(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 32 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

CGCGGCGGAT CCCAGGGAGC TGGGTTGACC GG 32

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 38 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

GGCCGCGAAT TCTCCGCGCC TGGCCGGGGT CCCTCAGC 38

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 36 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

CGCGGCGGAT CCTCTCCTCC CTCCCAAGCT GCAATC 36

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 36 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

CGCCGCGAAT TCTAGAACAG ATAGCCAGGC TGAGAG 36

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 24 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

TCACCCGGCG CGCCCCAGGT CGCT 24

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 61 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

ATGCTCGAGC GGCCGCCAGT GTGATGGATA TCTGCAGAGC TCAGCTTGGC CGCGAATTCT 60

A 61

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 78 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
(B) LAGE:49..60

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

TCACCCGGCG CGCCCCAGGT CGCTGAGGGA CCCCGGCCAG GCGCGGAG ATG GGG GCC 57
Met Gly Ala
1

CAC GGTGAGTACT CGCGGGCT 78
His

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 4 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

Met Gly Ala His
1

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 78 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
(B) LAGE:49..60

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

TCACCCGGCG CGCCCCAGGT CGCTGAGGGA CCCCGGCCAG GCGCGGAG ATG AGC GCC 57
Met Ser Ala
5

CAC GGTGAGTACT CGCGGGCT 78
His

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 4 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

Met Ser Ala His
1

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 78 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
(B) LAGE:49..60

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

TCACCCGGCG CGCCCCAGGT CGCTGAGGGA CCCCGGCCAG GCGCGGAG ATG GGG GTG 57
Met Gly Val
5

CCC GGTGAGTACT CGCGGGCT 78
Pro

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 4 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

Met Gly Val Pro
1

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 78 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
(B) LAGE:49..60

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

TCACCCGGCG CGCCCCAGGT CGCTGAGGGA CCCCGGCCAG GCGCCCAG ATG AGC GTG 57
Met Ser Val
5

CAC GGTGAGTACT CGCGGGCT 78
His

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 4 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

Met Ser Val His
1

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 59 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

GGACATTCTA GAACAGATAT CCAGGCTGAG CGTCAGGCGG GGAGGGAGAA GGGTGGCTG 59

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 16:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 48 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:

GTGATGGATA TCTCTAGAAC AGATAGCCAG GCTGAGAGTC AGGCGGGG 48

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 17:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 39 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17:

ATGGATATCA TCGATTCTAG AACAGATAGC CAGGCTGAG 39

Ansprüche

1. Humane Zelle,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie eine Kopie eines endogenen EPO-Gens in operativer Verknüpfung mit einem heterologen, in der humanen Zelle aktiven Promotor enthält und zur Produktion von mindestens 200 ng EPO/10^6 Zellen/24 h in der Lage ist.

2. Humane Zelle nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie zur Produktion von 200 - 3000 ng EPO/10^6 Zellen/24 h in der Lage ist.

3. Humane Zelle, erhältlich durch Genamplifikation aus einer Zelle nach Anspruch 1 oder Anspruch 2,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie mehrere Kopien eines endogenen EPO-Gens jeweils in operativer Verknüpfung mit einem heterologen, in der humanen Zelle aktiven Promotor enthält und zur Produktion von mindestens 1000 ng EPO/10^6 Zellen/24 h in der Lage ist.

4. Humane Zelle nach Anspruch 3,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie zur Produktion von 1000 - 25000 ng EPO/10^6 Zellen/24 h in der Lage ist.

5. Humane Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 4,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie eine immortalisierte Zelle ist.

6. Humane Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 5,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie in serumfreiem Medium kultivierbar ist.

7. Humane Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet,** daß sie aus einer HT 1080 Zelle, einer HeLa S3 Zelle, einer Namalwazelle oder einer davon abgeleiteten Zelle ausgewählt ist.

8. Humane Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 7, **dadurch gekennzeichnet,** daß das aktivierte endogene EPO-Gen unter Kontrolle eines viralen Promotors, insbesondere eines CMV-Promotors ist.

9. Humane Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 8, **dadurch gekennzeichnet,** daß das EPO Gen eine Signaleptid-kodierende Sequenz aufweist, die von der natürlichen Signalpeptid-kodierenden Sequenz verschieden ist.

10. Humane Zelle nach Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet,** daß das EPO-Gen, das in operativer Verknüpfung mit der heterologen Expressionskontrollsequenz ist, eine Signalpeptid-kodierende Sequenz aufweist, die für eine im Bereich der 4 ersten Aminosäuren modifizierte Signalpeptidsequenz kodiert, die ausgewählt ist aus:

$$Met\text{-}X_1\text{-}X_2\text{-}X_3$$

worin X_1 Gly oder Ser ist, X_2 Ala, Val, Leu, Ile, Ser oder Pro ist, X_3 und Pro, Arg, Cys oder His ist, mit der Maßgabe, daß $X_1\text{-}X_2\text{-}X_3$ nicht die Sequenz Gly-Val-His ist.

11. Humane Zelle nach Anspruch 10, **dadurch gekennzeichnet,** daß die ersten 4 Aminosäuren ausgewählt sind aus:

(a) Met-Gly-Ala-His,

(b) Met-Ser-Ala-His,

(c) Met-Gly-Val-Pro oder

(d) Met-Ser-Val-His.

12. Humane Zelle nach Anspruch 11,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Sequenz der ersten 4 Aminosäuren des Signalpeptids Met-Ser-Ala-His ist.

13. Verfahren zum Herstellen eines humanen EPO-produzierenden Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 12, umfassend die Schritte:
(a) Bereitstellen von humanen Ausgangszellen, die mindestens eine Kopie eines endogenen EPO-Gens enthalten,
(b) Transfizieren der Zellen mit einem DNA-Konstrukt umfassend:
(i) zwei flankierende DNA-Sequenzen, die homolog zu Bereichen des humanen EPO-Genlocus sind, um eine homologe Rekombination zu erlauben,
(ii) ein positives Selektionsmarkergen und
(iii) eine heterologe Expressionskontrollsequenz, die in der humanen Zelle aktiv ist,
(c) Kultivieren der transfizierten Zellen unter Bedingungen, bei denen eine Selektion auf das Vorhandensein des positiven Selektionsmarkergens stattfindet,
(d) Analysieren der gemäß Schritt (c) selektierbaren Zellen und
(e) Identifizieren der EPO-produzierenden Zellen.

14. Verfahren nach Anspruch 13,
dadurch gekennzeichnet,
daß die homologen DNA-Sequenzen ausgewählt werden aus dem Bereich der 5'-untranslatierten Sequenzen, Exon 1 und Intron 1 des EPO-Gens.

15. Verfahren nach Anspruch 14,
dadurch gekennzeichnet,
daß man eine im Bereich von Exon 1 modifizierte Sequenz verwendet.

16. Verfahren nach den Ansprüchen 14 oder 15,
dadurch gekennzeichnet,
daß man das Neomycinphosphotransferasegen als Selektionsmarkergen verwendet.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 16,
dadurch gekennzeichnet,
daß das DNA-Konstrukt weiterhin ein Amplifikationsgen umfaßt.

18. Verfahren nach Anspruch 17,
dadurch gekennzeichnet,
daß man ein Dihydrofolatreduktasegen als Amplifikationsgen verwendet.

19. Verfahren nach Anspruch 18,
dadurch gekennzeichnet,
daß man das Gen einer Dihydrofolatreduktase Arginin-Mutante als Amplifikationsgen verwendet.

20. Verfahren nach einem der Ansprüche 17 bis 19, weiterhin umfassend die Schritte:
(f) Amplifizieren des EPO-Gens und
(g) Gewinnen von EPO-produzierenden Zellen, die mehrere Kopien eines endogenen EPO-Gens jeweils in operativer Verknüpfung mit einer heterologen Expressionskontrollsequenz enthalten.

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 20,
dadurch gekennzeichnet,
daß man einen CMV-Promotor/Enhancer als Expressionskontrollsequenz verwendet.

22. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 21, **dadurch gekennzeichnet,** daß man als DNA-Konstrukt das Plasmid p189 (DSM 11661) oder ein davon abgeleitetes Plasmid in linearisierter Form verwendet.

23. DNA-Konstrukt zur Aktivierung eines endogenen EPO-Gens in einer humanen Zelle, umfassend:

(i) zwei flankierende DNA-Sequenzen, die homolog zu Bereichen des humanen EPO-Genlocus ausgewählt aus 5'-untranslatierten Sequenzen, Exon 1 und Intron 1 sind, um eine homologe Rekombination zu erlauben, wobei im Bereich von Exon 1 eine modifizierte Sequenz vorliegt, kodierend für die Aminosäuren:

$Met\text{-}X_1\text{-}X_2\text{-}X_3$

worin X_1 Gly oder Ser ist, X_2 Ala, Val, Leu, Ile, Ser oder Pro ist, X_3 und Pro, Arg, Cys oder His ist, mit der Maßgabe, daß $X_1\text{-}X_2\text{-}X_3$ nicht die Sequenz Gly-Val-His ist,

(ii) ein positives Selektionsmarkergen,

(iii) eine heterologe Expressionskontrollsequenz, die in einer humanen Zelle aktiv ist und

(iv) gegebenenfalls ein Amplifikationsgen.

24. DNA-Konstrukt nach Anspruch 23, **dadurch gekennzeichnet,** daß die Aminosäuren ausgewählt sind aus

(a) Met-Gly-Ala-His,

(b) Met-Ser-Ala-His,

(c) Met-Gly-Val-Pro oder

(d) Met-Ser-Val-His.

25. DNA-Konstrukt zur Aktivierung eines endogenen EPO-Gens in einer humanen Zelle, umfassend:

(i) zwei flankierende DNA-Sequenzen, die homolog zu Bereichen des humanen EPO-Genlocus ausgewählt aus 5'-untranslatierten Sequenzen, Exon 1 und Intron 1 sind, um eine homologe Rekombination zu erlauben,

(ii) ein positives Selektionsmarkergen,

(iii) eine heterologe Expressionskontrollsequenz, die in einer humanen Zelle aktiv ist, wobei der Abstand zwischen der heterologen Expressionskontrollsequenz und dem Translationstart des EPO-Gens nicht größer als 1100 bp ist, und

(iv) gegebenenfalls ein Amplifikationsgen.

26. Plasmid p189 (DSM 11661) oder ein davon abgeleitetes Plasmid

27. Verfahren zur Herstellung von humanem EPO,
dadurch gekennzeichnet,
daß man eine humane Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 12 unter Bedingungen in einem geeigneten Medium kultiviert, bei denen eine Produktion von EPO erfolgt und das EPO aus dem Kulturmedium gewinnt.

28. Verfahren nach Anspruch 27,
dadurch gekennzeichnet,
daß man ein serumfreies Medium verwendet.

29. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 oder 28,
dadurch gekennzeichnet,
daß man die Zellen in Suspension kultiviert.

30. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 bis 29,
dadurch gekennzeichnet,
daß man die Kultivierung in einem Fermenter durchführt.

31. Verfahren nach Anspruch 30,
dadurch gekennzeichnet,
daß das Volumen des Fermenters 10 l - 50000 l beträgt.

32. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 bis 31,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Gewinnung des EPO aus dem Kulturmedium die Schritte umfaßt:
(a) Leiten des Zellüberstands über ein Affinitätschromatographiemedium und Gewinnen der EPO enthaltenden Fraktionen,
(b) gegebenenfalls Leiten der EPO enthaltenden Fraktionen über ein hydrophobes-Interaktionschromatographiemedium und Gewinnen der EPO enthaltenden Fraktionen,
(c) Leiten der EPO enthaltenden Fraktionen über Hydroxyapatit und Gewinnen der EPO enthaltenden Fraktionen und
(d) Aufkonzentrierten oder/und Leiten über ein Reverse-Phase-HPLC-Medium.

33. Verfahren nach Anspruch 32,
dadurch gekennzeichnet,
daß man in Schritt (a) ein Blue-Sepharosemedium verwendet.

34. Verfahren nach einem der Ansprüche 32 oder 33,
dadurch gekennzeichnet,
daß man in Schritt (b) ein Butyl-Sepharosemedium verwendet.

35. Verfahren nach einem der Ansprüche 32 bis 34,
dadurch gekennzeichnet,
daß man das Aufkonzentrieren durch Ausschlußchromatographie durchführt.

36. Verfahren nach Anspruch 35,
dadurch gekennzeichnet,
daß man ein Medium mit einer Ausschlußgröße von 10 kD verwendet.

37. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 bis 36,
dadurch gekennzeichnet,
daß man ein humanes EPO mit einer Reinheit von mindestens 90% gewinnt.

38. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 bis 37,
dadurch gekennzeichnet,
daß man ein humanes EPO mit einer spezifischen Aktivität in vivo (normozythämische Maus) von mindestens 100000 IU/mg gewinnt.

39. Verfahren nach Anspruch 38,
dadurch gekennzeichnet,
daß man ein humanes EPO mit einer spezifischen Aktivität in vivo (normozythämische Maus) von mindestens 175.000 IU/mg bis 450.000 IU/mg gewinnt.

40. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 bis 39,
dadurch gekennzeichnet,
daß man ein humanes EPO mit einem Gehalt von weniger als 0,2 % N-Glycolneuraminsäure bezogen auf den Gehalt an N-Acetylneuraminsäure gewinnt.

41. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 bis 40,
dadurch gekennzeichnet,
daß man ein humanes EPO mit α-2,3-verknüpften Sialinsäureresten gewinnt.

42. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 bis 42,
dadurch gekennzeichnet,
daß man ein humanes EPO mit α-2,3- und α-2,6-verknüpften Sialinsäureresten gewinnt.

43. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 bis 42, **dadurch gekennzeichnet,** daß man ein humanes EPO gewinnt, welches ein Polypeptid mit einer Länge von 165 Aminosäuren umfaßt.

44. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 bis 42, **dadurch gekennzeichnet,** daß man ein humanes EPO gewinnt, welches ein Polypeptid mit einer Länge von 166 Aminosäuren umfaßt.

45. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 bis 42, **dadurch gekennzeichnet,** daß man ein humanes EPO gewinnt, welches ein Gemisch aus Polypeptiden mit einer Länge von 165 und 166 Aminosäuren umfaßt.

46. Isoliertes humanes EPO mit einer spezifischen Aktivität in vivo von mindestens 100 000 U/mg Protein, erhältlich durch das Verfahren nach einem der Ansprüche 27 bis 45, das frei von urinären Verunreinigungen ist.

47. Isoliertes humanes EPO nach Anspruch 46, **dadurch gekennzeichnet,** daß es eine Reinheit von mindestens 90% aufweist.

48. Isoliertes humanes EPO nach Anspruch 46 oder 47, **dadurch gekennzeichnet,** daß es weniger als 0,2 % N-Glycolneuraminsäure bezogen auf den Gehalt an N-Acetylneuraminsäure enthält.

49. Isoliertes humanes EPO nach einem der Ansprüche 46 bis 48, **dadurch gekennzeichnet,** daß es α-2,3-verknüpfte Sialinsäurereste trägt.

50. Isoliertes humanes EPO nach einem der Ansprüche 46 bis 49,
dadurch gekennzeichnet,
daß es α-2,3- und α-2,6-verknüpfte Sialinsäurereste trägt.

51. Isoliertes humanes EPO nach einem der Ansprüche 46 bis 50,
dadurch gekennzeichnet,
daß es ein Polypeptid mit einer Länge von 165 Aminosäureresten umfaßt.

52. Isoliertes humanes EPO nach einem der Ansprüche 46 bis 50,
dadurch gekennzeichnet,
daß es ein Polypeptid mit einer Länge von 166 Aminosäureresten umfaßt.

53. Isoliertes humanes EPO nach einem der Ansprüche 46 bis 50,
dadurch gekennzeichnet,
daß es ein Gemisch aus Polypeptiden mit einer Länge von 165 und 166 Aminosäuren umfaßt.

54. Pharmazeutisches Präparat,
dadurch gekennzeichnet,
daß es ein humanes EPO nach einem der Ansprüche 46 bis 53 als Wirkstoff gegebenenfalls zusammen mit anderen Wirkstoffen und pharmazeutisch üblichen Träger-, Hilfs- oder Zusatzstoffen enthält.

55. Isolierte DNA, die für ein humanes EPO mit einer im Bereich der ersten 4 Aminosäuren des Signalpeptids modifizierten Sequenz kodiert, die ausgewählt ist aus:

$Met\text{-}X_1\text{-}X_2\text{-}X_3$

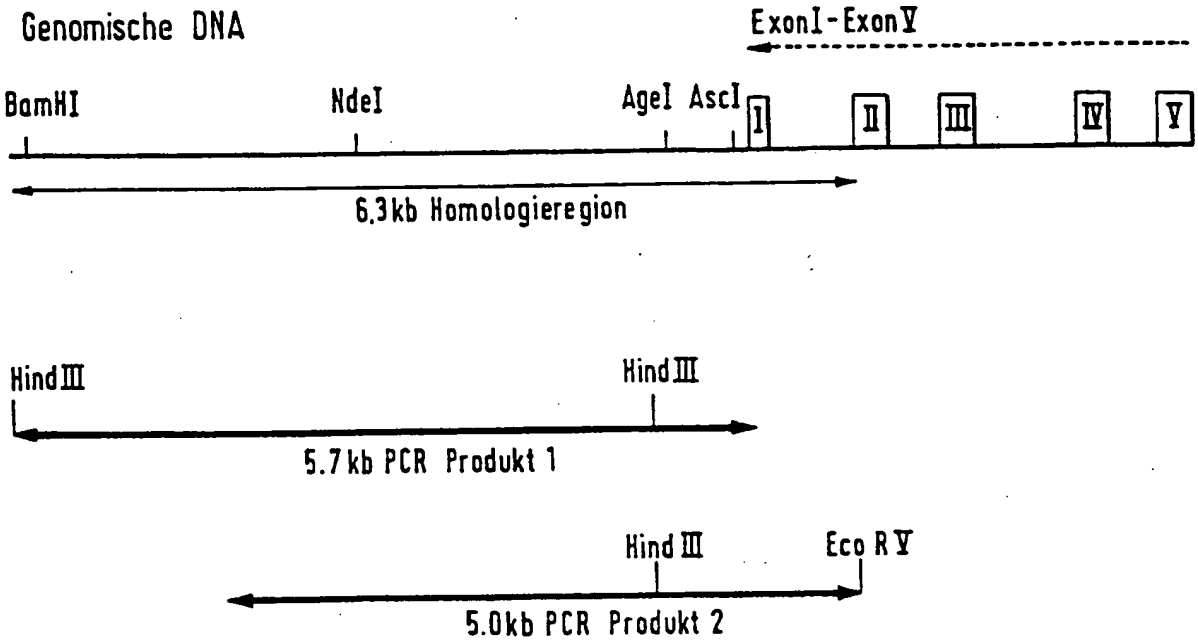
worin X_1 Gly oder Ser ist, X_2 Ala, Val, Leu, Ile, Ser oder Pro ist, X_3 und Pro, Arg, Cys oder His ist, mit der Maßgabe, daß X_1-X_2-X_3 nicht die Sequenz Gly-Val-His ist.

56. Isolierte DNA nach Anspruch 55,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Aminosäuresequenz ausgewählt ist aus:
(a) Met-Gly-Ala-His,
(b) Met-Ser-Ala-His,
(c) Met-Gly-Val-Pro oder
(d) Met-Ser-Val-His.

57. DNA nach Anspruch 55 oder 56,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie eine genomische DNA ist.

58. DNA nach Anspruch 55 oder 56,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie eine cDNA ist.

Abb. 1



Primer für PCR Produkt 1:

5' CGC GGC GGA TCC CAG GGA GCT GGG TTG ACC GG 3'
5' GGC CGC GAA TTC TCC GCG CCT GGC CGG GGT CCC TCA GC 3'

Primer für PCR Produkt 2:

5' CGC GGC GGA TCC TCT CCT CCC TCC CAA GCT GCA ATC 3'
5' GGC CGC GAA TTC TAG AAC AGA TAG CCA GGC TGA GAG 3'

Abb. 2

6 kB genomische DNA des EPO Gens in Vektor kloniert

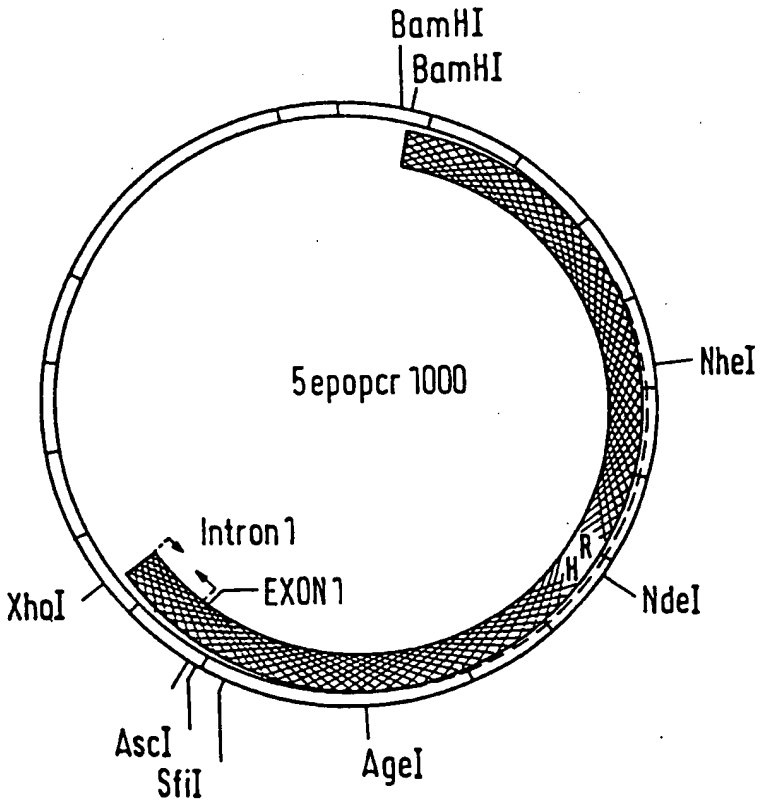


Abb. 3

Genaktivierungssequenz:



Abb. 4a

Konstruktion der EPO Gene Targeting Vektoren

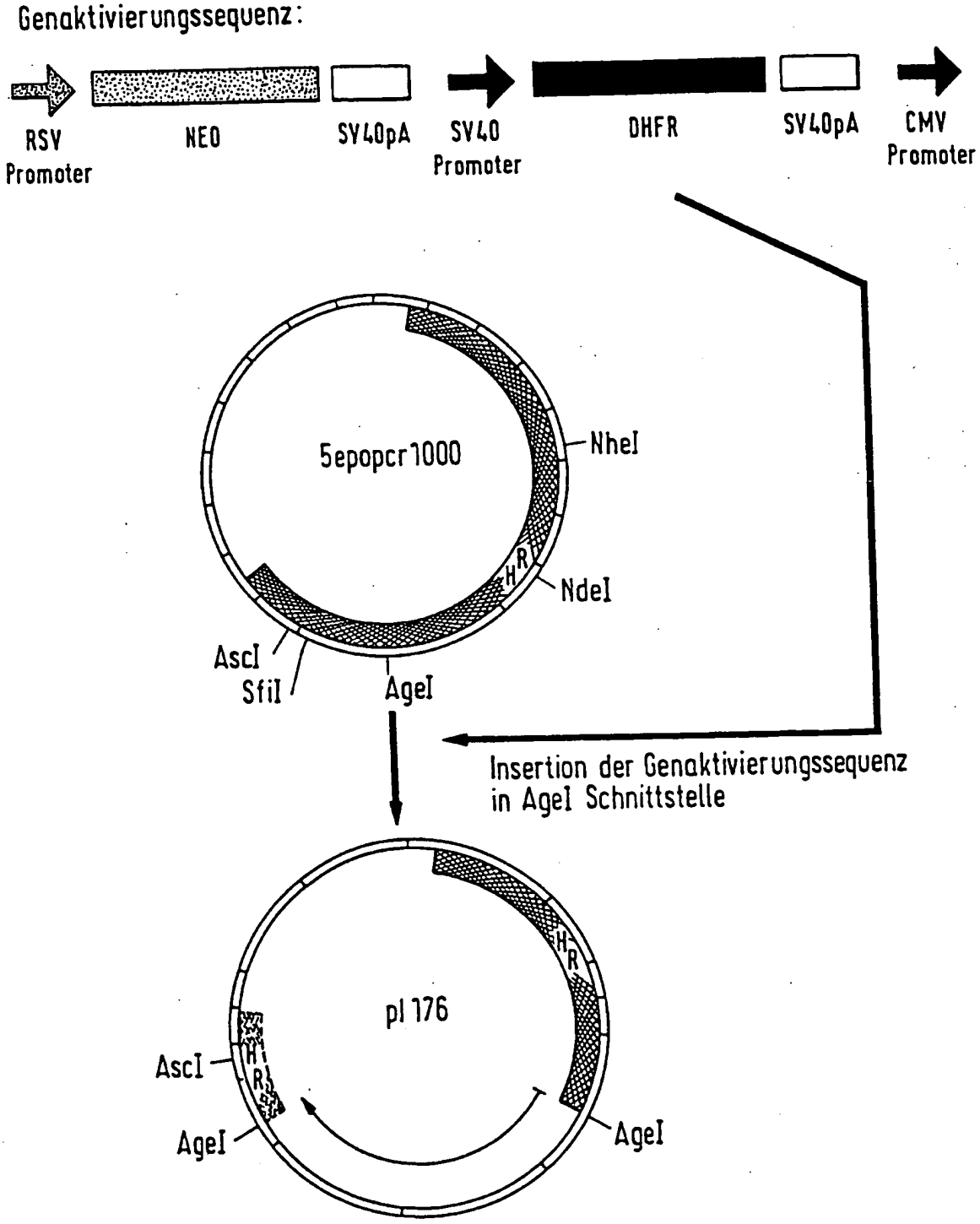


Abb. 4b

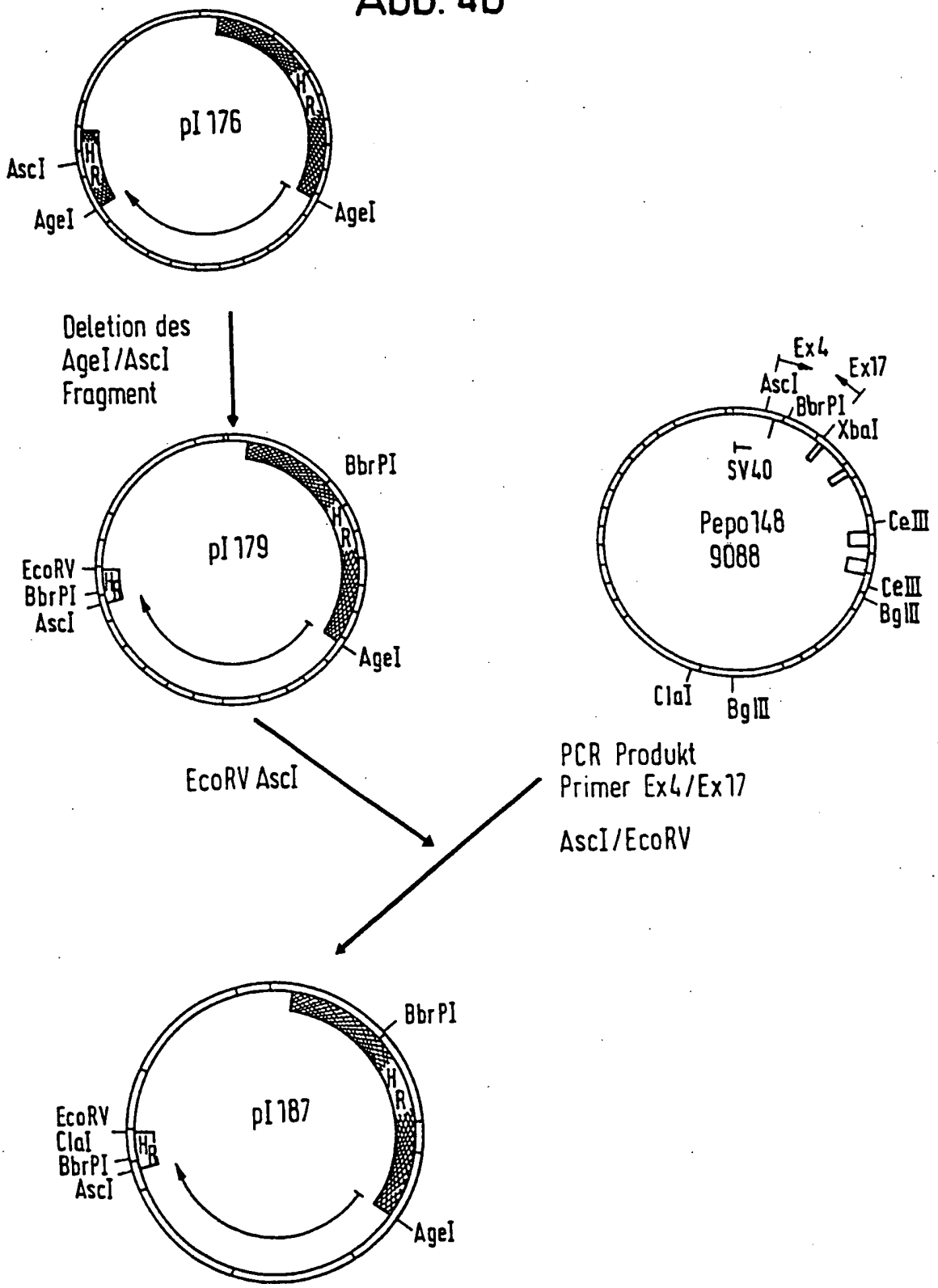

pI 176
AscI
AgeI
AgeI
Deletion des
AgeI/AscI
Fragment
pI 179
BbrPI
EcoRV
BbrPI
AscI
AgeI
Ex4
Ex17
AscI
BbrPI
XbaI
SV40
Pepo148
9088
CeIII
CeIII
BglII
ClaI
BglII
EcoRV AscI
PCR Produkt
Primer Ex4/Ex17
AscI/EcoRV
pI 187
BbrPI
EcoRV
ClaI
BbrPI
AscI
AgeI

Abb. 4c

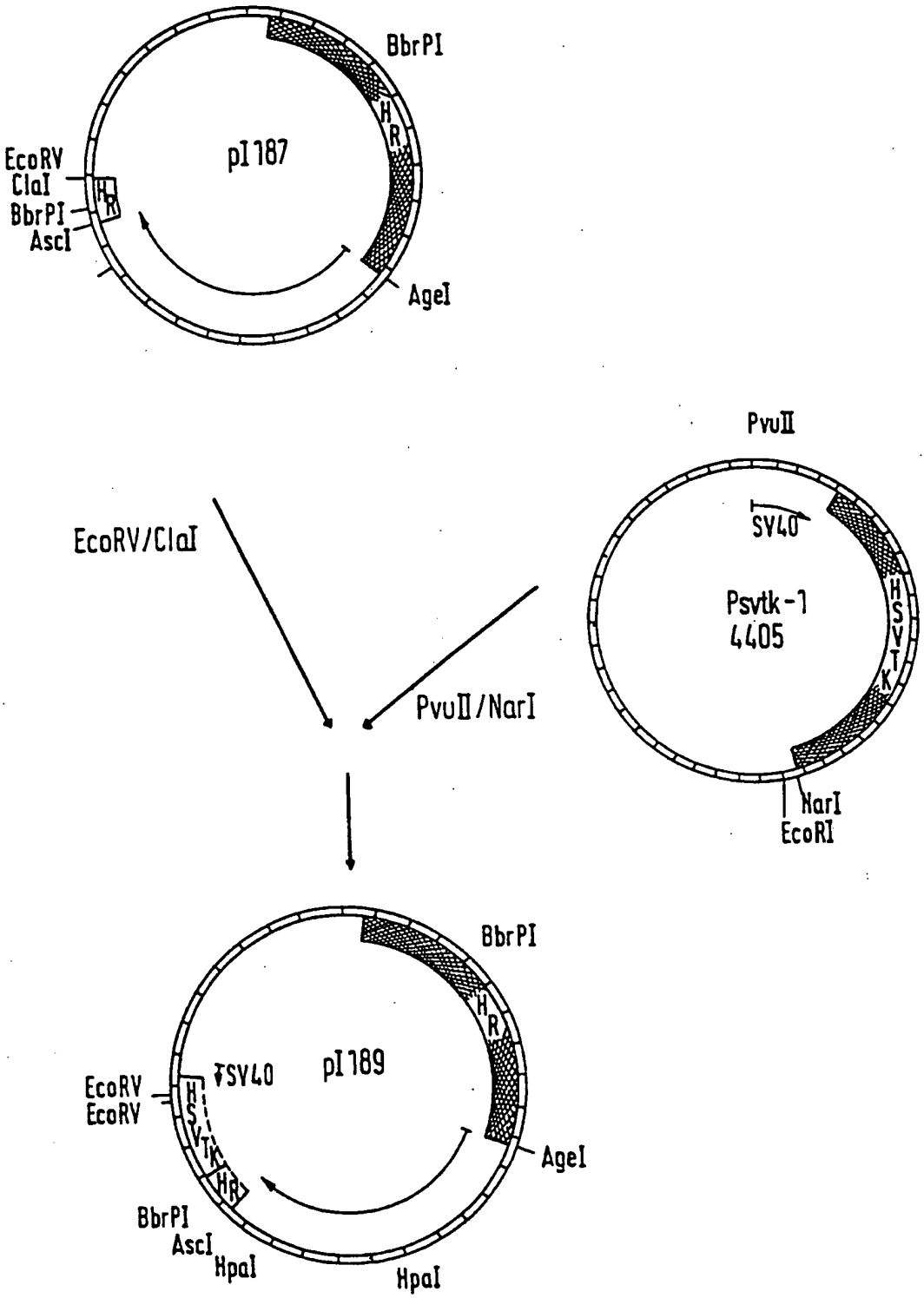

BbrPI
pI187
EcoRV
ClaI
BbrPI
AscI
AgeI
PvuII
SV40
Psvtk-1
4405
HSVTK
NarI
EcoRI
EcoRV/ClaI
PvuII/NarI
BbrPI
pI189
EcoRV
EcoRV
SV40
HSVTK
HR
AgeI
BbrPI
AscI
HpaI
HpaI

Abb. 4d

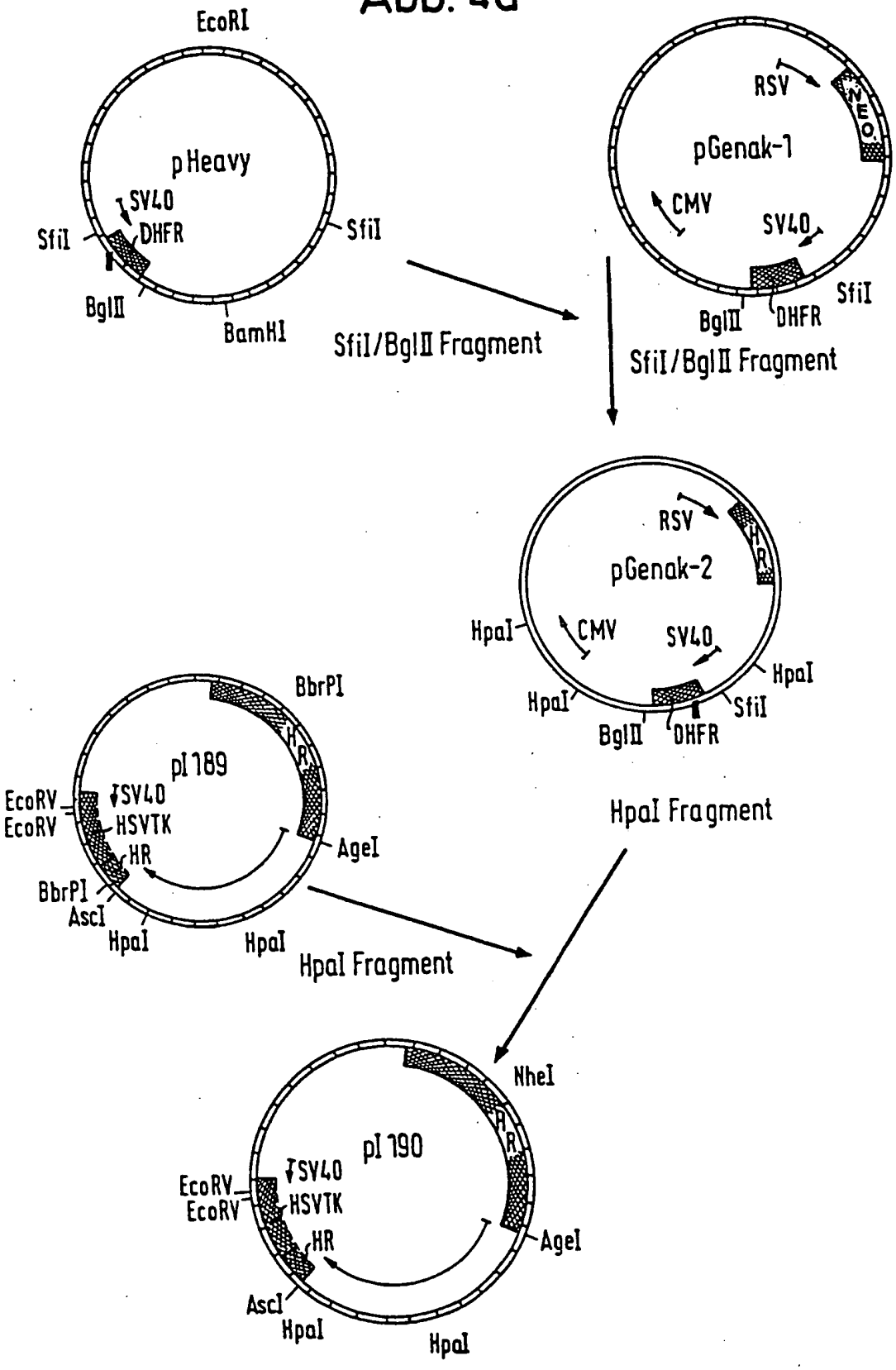

EcoRI
pHeavy
SV40
DHFR
SfiI
SfiI
BglII
BamHI
SfiI/BglII Fragment
RSV
NEO
pGenak-1
CMV
SV40
SfiI
BglII
DHFR
SfiI/BglII Fragment
RSV
HR
pGenak-2
HpaI
CMV
SV40
HpaI
HpaI
SfiI
BglII
DHFR
HpaI Fragment
BbrPI
HR
pI 189
EcoRV
EcoRV
SV40
HSVTK
HR
AgeI
BbrPI
AscI
HpaI
HpaI
HpaI Fragment
NheI
HR
pI 190
EcoRV
EcoRV
SV40
HSVTK
HR
AgeI
AscI
HpaI
HpaI

Abb. 4e

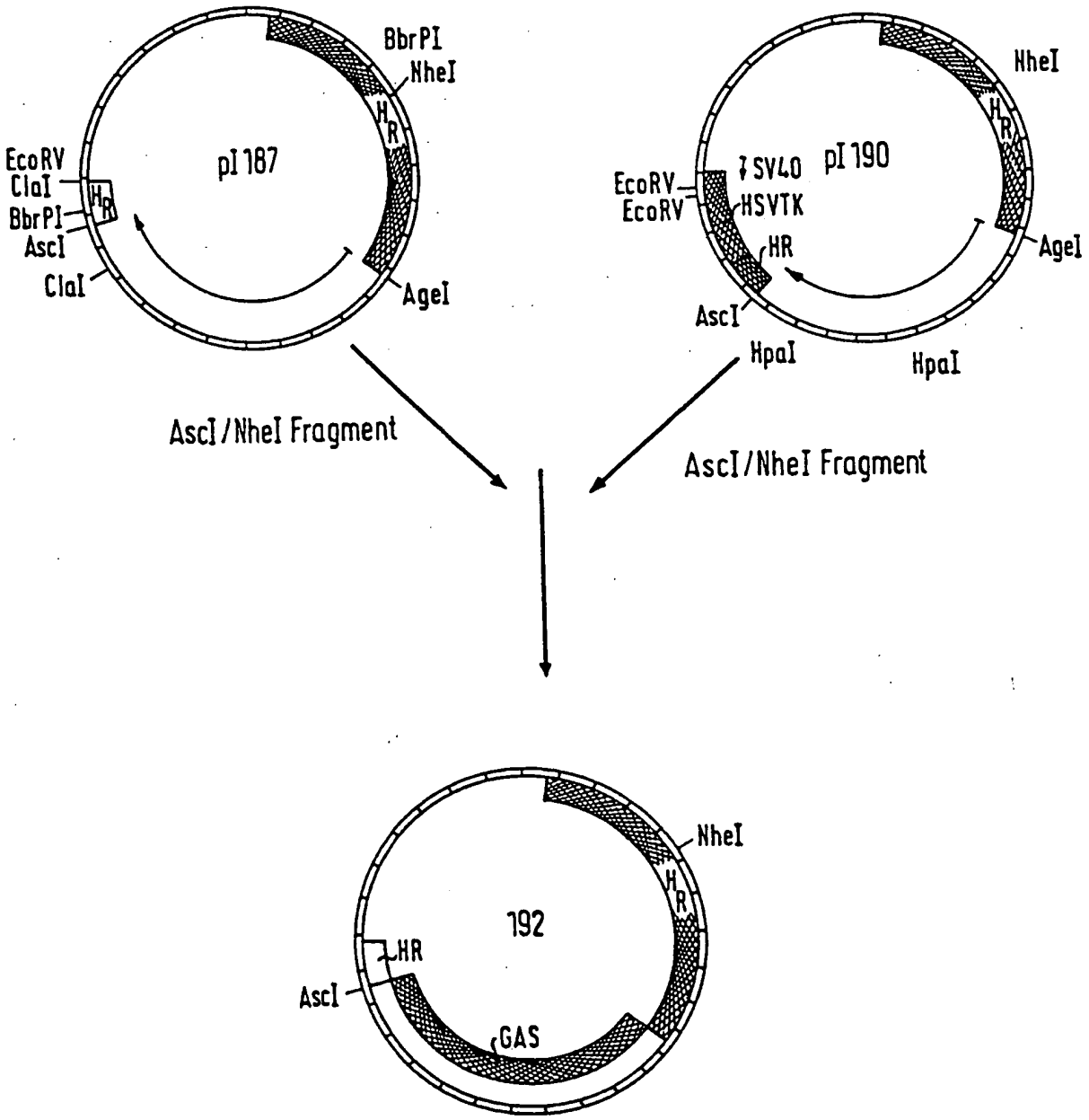
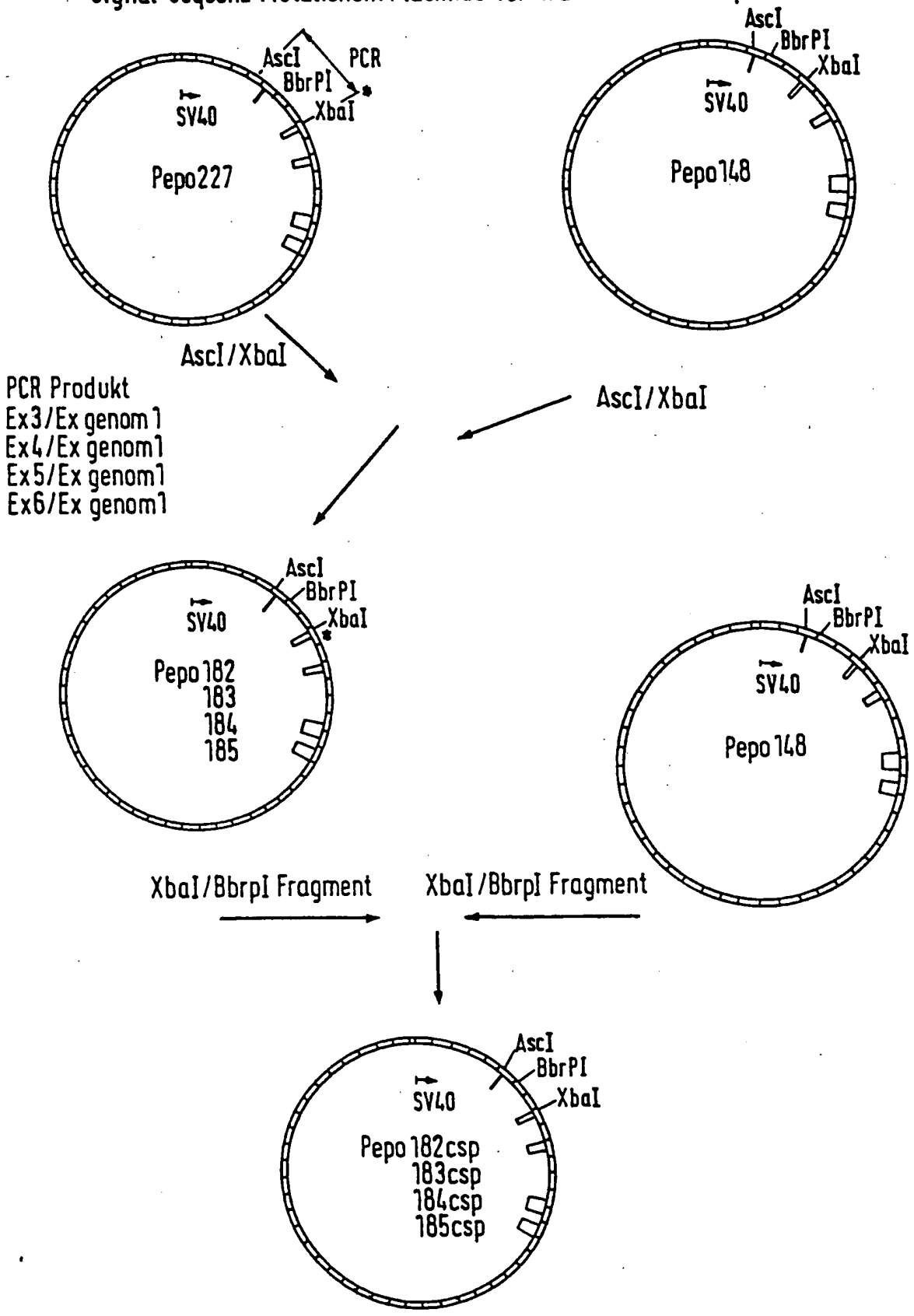

BbrPI
NheI
HR
EcoRV
ClaI
BbrPI
AscI
ClaI
pI 187
AgeI
AscI/NheI Fragment
NheI
HR
SV40
EcoRV
EcoRV
HSVTK
pI 190
HR
AgeI
AscI
HpaI
HpaI
AscI/NheI Fragment
NheI
HR
192
HR
AscI
GAS

Abb. 5

Signal Sequenz Mutationen: Plasmide für transiente EPO Expression



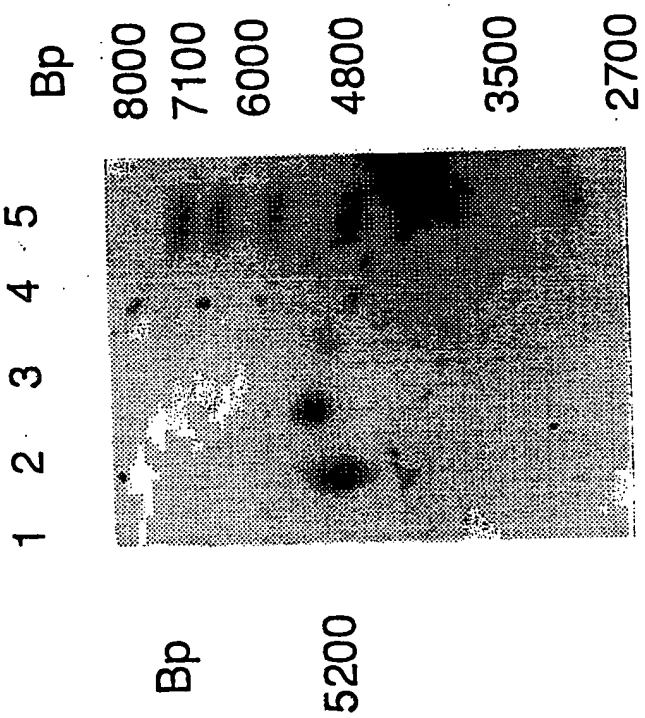


Abb.: 6 a

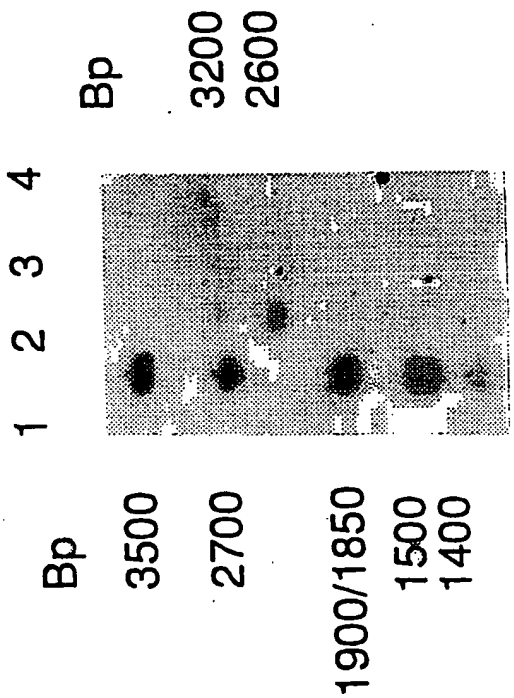


Abb.: 6 b

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In ational Application No
PCT/EP 98/04590

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N15/12 C12N15/85 C12N15/62 C12N15/90 C12N5/10
C07K14/505 A61K38/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C12N C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	RECNY M A ET AL: "STRUCTUAL CHARACTERIZATION OF NATURAL HUMAN URINARY AND RECOMBINANT DNA-DERIVED ERYTHROPOIETIN" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 262, no. 35, 15 December 1987, pages 17156-17163, XP002015827 see the whole document ---	46,47, 51,54
X	WO 96 19573 A (CANGENE CORP ;DELCUVE GENEVIEVE (CA)) 27 June 1996 see page 6, line 33 - page 7, line 4 ---	46-54
A	WO 95 31560 A (TRANSKARYOTIC THERAPIES INC ;TRECO DOUGLAS A (US); HEARTLEIN MICHA) 23 November 1995 cited in the application see the whole document ---	1-58

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
30 November 1998	08/12/1998

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Hornig, H

3

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication.where appropriate. of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 94 12650 A (TRANSKARYOTIC THERAPIES INC) 9 June 1994 cited in the application see the whole document	1-58
A	WO 93 09222 A (TRANSKARYOTIC THERAPIES INC) 13 May 1993 cited in the application see the whole document	1-58
A	EP 0 747 485 A (CELL GENESYS INC) 11 December 1996 see the whole document	1-58
A	WO 96 29411 A (TRANSKARYOTIC THERAPIES INC ;TRECO DOUGLAS A (US); HEARTLEIN MICHA) 26 September 1996 see the whole document	1-58
A	WO 91 09955 A (APPLIED RESEARCH SYSTEMS ;CHAPPEL SCOTT C (US)) 11 July 1991 cited in the application see the whole document	1-58
A	WO 96 35718 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH ;BURG JOSEF (DE); SCHNEIDER WALTER (DE);) 14 November 1996 see page 6, line 14 - line 23	1-58
A	EP 0 232 034 A (SUMITOMO CHEMICAL CO ;SUMITOMO PHARMA (JP)) 12 August 1987 see the whole document	1-58
A	EP 0 267 678 A (INTEGRATED GENETICS INC) 18 May 1988 see the whole document	1-58
A	EP 0 411 678 A (GENETICS INST) 6 February 1991 see page 10, line 39 - line 49	1-58
A	KRYSTAL G ET AL: "PURIFICATION OF HUMAN ERYTHROPOIETIN TO HOMOGENEITY BY A RAPID FIVE-STEP PROCEDURE" BLOOD, vol. 67, no. 1, January 1986, pages 71-79, XP002052352 see the whole document	1-58

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In tional Application No
PCT/EP 98/04590

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication,where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SIMONSEN C C ET AL: "ISOLATION AND EXPRESSION OF AN ALTERED MOUSE DIHYDROFOLATE REDUCTASE CDNA" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 80, May 1983, pages 2495-2499, XP002052351 see the whole document	1-58

3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP 98/04590

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9619573 A	27-06-1996	AU 692968 B	18-06-1998
		AU 4169296 A	10-07-1996
		CA 2208013 A	27-06-1996
		EP 0800577 A	15-10-1997
WO 9531560 A	23-11-1995	US 5641670 A	24-06-1997
		AU 2550495 A	05-12-1995
		BR 9507874 A	19-08-1997
		CA 2190289 A	23-11-1995
		CN 1119545 A	03-04-1996
		CZ 9603258 A	17-12-1997
		EP 0759082 A	26-02-1997
		FI 964536 A	09-01-1997
		HU 76844 A	28-11-1997
		JP 10500570 T	20-01-1998
		NO 964802 A	09-01-1997
		NZ 285945 A	25-03-1998
		SK 146196 A	04-02-1998
		US 5733746 A	31-03-1998
		ZA 9503879 A	18-01-1996
WO 9412650 A	09-06-1994	AU 689455 B	02-04-1998
		AU 5736294 A	22-06-1994
		AU 5840198 A	04-06-1998
		CA 2151032 A	09-06-1994
		EP 0672160 A	20-09-1995
		JP 8503856 T	30-04-1996
		MX 9307623 A	30-06-1994
		NZ 259165 A	26-01-1998
		SG 46476 A	20-02-1998
		US 5641670 A	24-06-1997
		US 5733746 A	31-03-1998
		US 5733761 A	31-03-1998
WO 9309222 A	13-05-1993	AT 155810 T	15-08-1997
		AU 669499 B	13-06-1996
		AU 3069892 A	07-06-1993
		AU 6563196 A	28-11-1996
		DE 69221168 D	04-09-1997
		DE 69221168 T	26-02-1998
		DK 649464 T	02-03-1998
		EP 0649464 A	26-04-1995
		EP 0750044 A	27-12-1996
		ES 2106891 T	16-11-1997
		GR 3025054 T	30-01-1998
		JP 7500969 T	02-02-1995
		MX 9206376 A	28-02-1994
		NZ 245015 A	21-12-1995
		NZ 270805 A	24-10-1997
		NZ 270864 A	24-10-1997
		PT 101031 A	28-02-1994
		SG 44652 A	19-12-1997
		US 5641670 A	24-06-1997
		US 5733746 A	31-03-1998
		US 5733761 A	31-03-1998
EP 0747485 A	11-12-1996	AT 139574 T	15-07-1996
		AU 635844 B	01-04-1993

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP 98/04590

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0747485 A		AU 7740791 A	31-05-1991
		CA 2045175 A	07-05-1991
		DE 69027526 D	25-07-1996
		DE 69027526 T	05-12-1996
		DK 452484 T	14-10-1996
		EP 0452484 A	23-10-1991
		ES 2090297 T	16-10-1996
		GR 3021105 T	31-12-1996
		JP 4505104 T	10-09-1992
		WO 9106666 A	16-05-1991
		WO 9106667 A	16-05-1991
		US 5578461 A	26-11-1996
WO 9629411 A	26-09-1996	US 5733746 A	31-03-1998
		AU 5362596 A	08-10-1996
		CA 2215618 A	26-09-1996
		EP 0815232 A	07-01-1998
WO 9109955 A	11-07-1991	AT 156189 T	15-08-1997
		AU 645294 B	13-01-1994
		AU 7183691 A	24-07-1991
		BG 60624 B	31-10-1995
		CA 2071989 A	23-06-1991
		DE 69031172 D	04-09-1997
		DE 69031172 T	12-03-1998
		DK 505500 T	25-08-1997
		EP 0505500 A	30-09-1992
		EP 0779362 A	18-06-1997
		ES 2104690 T	16-10-1997
		FI 922863 A	18-06-1992
		GR 3025057 T	30-01-1998
		JP 5504682 T	22-07-1993
		LT 1595 A,B	25-07-1995
		LV 10655 A	20-04-1995
		LV 10655 B	20-08-1995
		OA 9594 A	30-04-1993
		US 5272071 A	21-12-1993
WO 9635718 A	14-11-1996	AU 5817496 A	29-11-1996
		CA 2220515 A	14-11-1996
		EP 0830376 A	25-03-1998
		JP 10506924 T	07-07-1998
EP 0232034 A	12-08-1987	JP 62171696 A	28-07-1987
		DE 3780179 A	13-08-1992
EP 0267678 A	18-05-1988	US 4954437 A	04-09-1990
		AU 7842987 A	16-03-1989
		DK 478287 A	16-03-1988
		FI 873897 A	16-03-1988
		JP 63185396 A	30-07-1988
		PT 85699 B	31-08-1990
EP 0411678 A	06-02-1991	AU 621535 B	19-03-1992
		AU 5313486 A	01-07-1986
		CZ 8508804 A	14-08-1996
		DE 3585161 A	20-02-1992
		DK 368786 A	01-08-1986

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Ir ational Application No
PCT/EP 98/04590

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0411678 A		DK 610784 A	16-08-1985
		EP 0205564 A	30-12-1986
		FI 863044 A	24-07-1986
		GR 852890 A	03-04-1986
		HK 105593 A	15-10-1993
		HK 105693 A	15-10-1993
		JP 1257480 A	13-10-1989
		JP 6055144 B	27-07-1994
		JP 2104284 A	17-04-1990
		JP 10052266 A	24-02-1998
		JP 2000442 A	05-01-1990
		JP 9107978 A	28-04-1997
		JP 2693361 B	24-12-1997
		JP 6189758 A	12-07-1994
		JP 2648301 B	27-08-1997
		JP 61012288 A	20-01-1986
		JP 7184681 A	25-07-1995
		JP 1044317 B	27-09-1989
		JP 62501010 T	23-04-1987
		LT 1481 A,B	26-06-1995
		LV 10505 A	20-02-1995
		LV 10505 B	20-04-1996
		LV 10507 A	20-02-1995
		LV 10507 B	20-06-1996
		MD 940371 A	28-06-1996
		PT 81590 B	20-10-1987
		SG 93993 G	25-02-1994
		SG 94093 G	25-02-1994
		WO 8603520 A	19-06-1986
		SU 1672930 A	23-08-1991
		DD 279687 A	13-06-1990
		MD 95 B	30-11-1994
		MX 9203298 A	01-07-1992
		SU 1801118 A	07-03-1993

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In ...tionales Aktenzeichen
PCT/EP 98/04590

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C12N15/12 C12N15/85 C12N15/62 C12N15/90 C12N5/10
C07K14/505 A61K38/18

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 C12N C07K A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	RECNY M A ET AL: "STRUCTUAL CHARACTERIZATION OF NATURAL HUMAN URINARY AND RECOMBINANT DNA-DERIVED ERYTHROPOIETIN" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 262, Nr. 35, 15. Dezember 1987, Seiten 17156-17163, XP002015827 siehe das ganze Dokument ---	46,47, 51,54
X	WO 96 19573 A (CANGENE CORP ;DELCUVE GENEVIEVE (CA)) 27. Juni 1996 siehe Seite 6, Zeile 33 - Seite 7, Zeile 4 ---	46-54
A	WO 95 31560 A (TRANSKARYOTIC THERAPIES INC ;TRECO DOUGLAS A (US); HEARTLEIN MICHA) 23. November 1995 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-58

-/--

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

[X] Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
30. November 1998	08/12/1998

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Hornig, H

3

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 94 12650 A (TRANSKARYOTIC THERAPIES INC) 9. Juni 1994 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument	1-58
A	WO 93 09222 A (TRANSKARYOTIC THERAPIES INC) 13. Mai 1993 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument	1-58
A	EP 0 747 485 A (CELL GENESYS INC) 11. Dezember 1996 siehe das ganze Dokument	1-58
A	WO 96 29411 A (TRANSKARYOTIC THERAPIES INC ;TRECO DOUGLAS A (US); HEARTLEIN MICHA) 26. September 1996 siehe das ganze Dokument	1-58
A	WO 91 09955 A (APPLIED RESEARCH SYSTEMS ;CHAPPEL SCOTT C (US)) 11. Juli 1991 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument	1-58
A	WO 96 35718 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH ;BURG JOSEF (DE); SCHNEIDER WALTER (DE);) 14. November 1996 siehe Seite 6, Zeile 14 - Zeile 23	1-58
A	EP 0 232 034 A (SUMITOMO CHEMICAL CO ;SUMITOMO PHARMA (JP)) 12. August 1987 siehe das ganze Dokument	1-58
A	EP 0 267 678 A (INTEGRATED GENETICS INC) 18. Mai 1988 siehe das ganze Dokument	1-58
A	EP 0 411 678 A (GENETICS INST) 6. Februar 1991 siehe Seite 10, Zeile 39 - Zeile 49	1-58
A	KRYSTAL G ET AL: "PURIFICATION OF HUMAN ERYTHROPOIETIN TO HOMOGENEITY BY A RAPID FIVE-STEP PROCEDURE" BLOOD, Bd. 67, Nr. 1, Januar 1986, Seiten 71-79, XP002052352 siehe das ganze Dokument	1-58

-/--

In ationales Aktenzeichen
PCT/EP 98/04590

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	SIMONSEN C C ET AL: "ISOLATION AND EXPRESSION OF AN ALTERED MOUSE DIHYDROFOLATE REDUCTASE CDNA" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, Bd. 80, Mai 1983, Seiten 2495-2499, XP002052351 siehe das ganze Dokument	1-58

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 98/04590

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9619573 A	27-06-1996	AU	692968 B	18-06-1998
		AU	4169296 A	10-07-1996
		CA	2208013 A	27-06-1996
		EP	0800577 A	15-10-1997
WO 9531560 A	23-11-1995	US	5641670 A	24-06-1997
		AU	2550495 A	05-12-1995
		BR	9507874 A	19-08-1997
		CA	2190289 A	23-11-1995
		CN	1119545 A	03-04-1996
		CZ	9603258 A	17-12-1997
		EP	0759082 A	26-02-1997
		FI	964536 A	09-01-1997
		HU	76844 A	28-11-1997
		JP	10500570 T	20-01-1998
		NO	964802 A	09-01-1997
		NZ	285945 A	25-03-1998
		SK	146196 A	04-02-1998
		US	5733746 A	31-03-1998
		ZA	9503879 A	18-01-1996
WO 9412650 A	09-06-1994	AU	689455 B	02-04-1998
		AU	5736294 A	22-06-1994
		AU	5840198 A	04-06-1998
		CA	2151032 A	09-06-1994
		EP	0672160 A	20-09-1995
		JP	8503856 T	30-04-1996
		MX	9307623 A	30-06-1994
		NZ	259165 A	26-01-1998
		SG	46476 A	20-02-1998
		US	5641670 A	24-06-1997
		US	5733746 A	31-03-1998
		US	5733761 A	31-03-1998
WO 9309222 A	13-05-1993	AT	155810 T	15-08-1997
		AU	669499 B	13-06-1996
		AU	3069892 A	07-06-1993
		AU	6563196 A	28-11-1996
		DE	69221168 D	04-09-1997
		DE	69221168 T	26-02-1998
		DK	649464 T	02-03-1998
		EP	0649464 A	26-04-1995
		EP	0750044 A	27-12-1996
		ES	2106891 T	16-11-1997
		GR	3025054 T	30-01-1998
		JP	7500969 T	02-02-1995
		MX	9206376 A	28-02-1994
		NZ	245015 A	21-12-1995
		NZ	270805 A	24-10-1997
		NZ	270864 A	24-10-1997
		PT	101031 A	28-02-1994
		SG	44652 A	19-12-1997
		US	5641670 A	24-06-1997
		US	5733746 A	31-03-1998
		US	5733761 A	31-03-1998
EP 0747485 A	11-12-1996	AT	139574 T	15-07-1996
		AU	635844 B	01-04-1993

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 98/04590

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0747485 A		AU 7740791 A	31-05-1991
		CA 2045175 A	07-05-1991
		DE 69027526 D	25-07-1996
		DE 69027526 T	05-12-1996
		DK 452484 T	14-10-1996
		EP 0452484 A	23-10-1991
		ES 2090297 T	16-10-1996
		GR 3021105 T	31-12-1996
		JP 4505104 T	10-09-1992
		WO 9106666 A	16-05-1991
		WO 9106667 A	16-05-1991
		US 5578461 A	26-11-1996
WO 9629411 A	26-09-1996	US 5733746 A	31-03-1998
		AU 5362596 A	08-10-1996
		CA 2215618 A	26-09-1996
		EP 0815232 A	07-01-1998
WO 9109955 A	11-07-1991	AT 156189 T	15-08-1997
		AU 645294 B	13-01-1994
		AU 7183691 A	24-07-1991
		BG 60624 B	31-10-1995
		CA 2071989 A	23-06-1991
		DE 69031172 D	04-09-1997
		DE 69031172 T	12-03-1998
		DK 505500 T	25-08-1997
		EP 0505500 A	30-09-1992
		EP 0779362 A	18-06-1997
		ES 2104690 T	16-10-1997
		FI 922863 A	18-06-1992
		GR 3025057 T	30-01-1998
		JP 5504682 T	22-07-1993
		LT 1595 A,B	25-07-1995
		LV 10655 A	20-04-1995
		LV 10655 B	20-08-1995
		OA 9594 A	30-04-1993
		US 5272071 A	21-12-1993
WO 9635718 A	14-11-1996	AU 5817496 A	29-11-1996
		CA 2220515 A	14-11-1996
		EP 0830376 A	25-03-1998
		JP 10506924 T	07-07-1998
EP 0232034 A	12-08-1987	JP 62171696 A	28-07-1987
		DE 3780179 A	13-08-1992
EP 0267678 A	18-05-1988	US 4954437 A	04-09-1990
		AU 7842987 A	16-03-1989
		DK 478287 A	16-03-1988
		FI 873897 A	16-03-1988
		JP 63185396 A	30-07-1988
		PT 85699 B	31-08-1990
EP 0411678 A	06-02-1991	AU 621535 B	19-03-1992
		AU 5313486 A	01-07-1986
		CZ 8508804 A	14-08-1996
		DE 3585161 A	20-02-1992
		DK 368786 A	01-08-1986

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

In tionales Aktenzeichen
PCT/EP 98/04590

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
EP 0411678 A		DK	610784 A	16-08-1985
		EP	0205564 A	30-12-1986
		FI	863044 A	24-07-1986
		GR	852890 A	03-04-1986
		HK	105593 A	15-10-1993
		HK	105693 A	15-10-1993
		JP	1257480 A	13-10-1989
		JP	6055144 B	27-07-1994
		JP	2104284 A	17-04-1990
		JP	10052266 A	24-02-1998
		JP	2000442 A	05-01-1990
		JP	9107978 A	28-04-1997
		JP	2693361 B	24-12-1997
		JP	6189758 A	12-07-1994
		JP	2648301 B	27-08-1997
		JP	61012288 A	20-01-1986
		JP	7184681 A	25-07-1995
		JP	1044317 B	27-09-1989
		JP	62501010 T	23-04-1987
		LT	1481 A,B	26-06-1995
		LV	10505 A	20-02-1995
		LV	10505 B	20-04-1996
		LV	10507 A	20-02-1995
		LV	10507 B	20-06-1996
		MD	940371 A	28-06-1996
		PT	81590 B	20-10-1987
		SG	93993 G	25-02-1994
		SG	94093 G	25-02-1994
		WO	8603520 A	19-06-1986
		SU	1672930 A	23-08-1991
		DD	279687 A	13-06-1990
		MD	95 B	30-11-1994
		MX	9203298 A	01-07-1992
		SU	1801118 A	07-03-1993